

**Universidad Autónoma de Madrid**  
**Departamento de Bioquímica**

**Papel de la 5-Lipooxigenasa y la  
Ciclooxigenasa-2 en la Génesis de  
la Aterosclerosis. Implicación del  
Factor de Transcripción NF- $\kappa$ B.**

**Eva M<sup>a</sup> Sánchez Galán**  
**Madrid, 2008**

**Departamento de Bioquímica  
Facultad de Medicina  
Universidad Autónoma de Madrid**

**Papel de la 5-Lipooxigenasa y la  
Ciclooxigenasa-2 en la Génesis de la  
Aterosclerosis. Implicación del  
Factor de Transcripción NF- $\kappa$ B.**

**Tesis Doctoral**

**Eva M<sup>a</sup> Sánchez Galán  
Licenciada en Ciencias Biológicas**

**Directores: Jesús Egido de los Ríos y José Tuñón Fernández  
Laboratorio de Nefrología Experimental y Patología Vascular  
Fundación Jiménez Díaz**



Don Jesús Egido de los Ríos, Catedrático de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid, y Don José Tuñón Fernández, Profesor Asociado de Medicina en la Universidad Autónoma de Madrid.

#### CERTIFICAN

Que Doña Eva M<sup>a</sup> Sánchez Galán, Licenciada en Ciencias Biológicas por la Universidad Complutense de Madrid, ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado “Papel de la 5-Lipooxigenasa y la Ciclooxygenasa-2 en la génesis de la aterosclerosis. Implicación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B” que presenta como Tesis Doctoral para alcanzar el grado de Doctora por la Universidad Autónoma de Madrid.

Y para que conste, firmamos la presente en Madrid a 28 de Marzo del 2008

Dr. Jesús Egido de los Ríos

Dr. José Tuñón Fernández

“Hay una fuerza motriz más poderosa que el vapor,  
la electricidad y la energía atómica: la voluntad.”  
*Albert Einstein*

*A mis padres, Antonio y Mari*

*A Ángel*

Por fin ha llegado el momento!!!!. Muchas veces, a lo largo de todo este tiempo, me he planteado la opción de comenzar y acabar esta sección únicamente con la palabra “Gracias”, y nada más. Sencillamente, por evitar resumir en un par de folios todo el apoyo, paciencia, ayuda, buenos y malos momentos compartidos durante estos años. Pero finalmente, sabiendo que estas van a ser las páginas más leídas seguramente de toda la tesis, me decidí a escribir alguna palabra más.

En primer lugar, gracias al Dr Egido, por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio, aprender de todo un maestro y enseñarme lo que es ser jefe. Quiero agradecer especialmente al Dr Tuñón (que raro se me hace llamarte así), y a José Luis, por todo el apoyo, ayuda y tiempo robado, pero sin vuestros comentarios esto no habría quedado igual, sinceramente, muchísimas gracias.

Quién nos iba a decir Elsi, que íbamos a estar juntas tanto tiempo???, gracias por estar siempre ahí y ayudar a levantarme, eres de lo mejor que hay aquí (no es amor de amiga eh?), y espero tenerte siempre. Y que le voy a decir a mi “Crispi”, que me alegraba cada día con esa supersonrisa, gracias por dejarme ser tu amiga, es todo un placer. Bueno chicas, ya sabéis, ¡¡¡ARRIBA EL PODER DE TRES!!!, vais a conseguir todo lo que os propongáis. Seguimos con el clan chicas, Bea, muchas gracias por todas las risas que nos echamos aunque a veces me des un poco de miedo, y deja de levantar el labio!!!!. Van, se te echa mucho de menos, tu sonrisa (además de tu vestuario) es único, espero que sigas así y que no te pierdas en el mundo CNIC. Conchi, mis rizitos de oro, en breve vuelvo a mi sitio, que no te he abandonado. Virchu, muchas gracias por enseñarme a ver las cosas desde otra perspectiva, aunque a veces pierda la paciencia, eres guay. Esther, que no me olvido de ti, mucha suerte en tu nueva etapa, deja de currar un rato y ven a vernos, Miriam, ánimo que te falta el último empujón y esto está hecho, que a empeño no hay quien te gane. Jon, el supercerebro, ha sido un placer trabajar contigo, gracias por tu ayuda, y aunque te vayas lejos espero seguir estando cerca. Avo y A3, que os voy a decir a vosotros dos, desvergonzados, sois geniales, por cierto Alberto, creo que tu esclavo se soltó hace mucho la cadena, así se hace Avo!!!. El super Alfi, ojalá abundase la gente tan auténtica como tu, gracias por esos chistes inolvidables, aunqueuviésemos que bajar los decibelios. Julito, gracias por tu apoyo y por esas charlas en los momentos bajos, se agradecían un montón. Charli, la autoridad, o era la eminencia?, nunca me entero, gracias por echarme un cable e intentar buscar soluciones, pero habla más lento porfa!!!. Albertito, el artista, muchas gracias por tu ayuda en el labo, pero muchas más por aquel gran regalo, que deja a las visitas con la boca abierta, te mereces lo mejor.

Gracias a toda la gente nueva que ha llegado últimamente, siempre es necesario aire fresco, Irene, me ha encantado descubrir lo que hay detrás de esa gran timidez. Sara, no pierdas nunca esa espontaneidad que te hace única y al final harás que vuelva a ver “El Rey León”. A Javi (el hombre de pocas palabras y muchos gestos), Raúl (gracias por perder tu tiempo y aguantar a las de 3<sup>er</sup> ciclo por mi culpa), Sandra (enhorabuena por el carnét).

También quiero agradecer al resto de la gente del labo toda la ayuda que me han prestado. A Luis, gracias por tus sugerencias y aclaraciones. A Bego, sin esos monocitos la figura del paper no estaría igual. A Carmen y Marta siempre dispuestas a echar un cable. A Rosario, gracias por ayudarme siempre que lo he necesitado. A Ana (nos echamos unas risas en los cursos eh?), Lupe,

Loli, Roxana, Raquel, Paula, Susana, Juan “el cordobés”, Beñat, Julio, Óscar Lorenzo, Óscar López, Sebas, David.

A los que se fueron y que espero que haya sido para mejor: a Almu, muchas gracias por tu dedicación y por esa ayuda tan importante en muchos momentos, a Puri, Pilar, Sergio, Guillermo, Vero, Félix, Maru..., un recuerdo muy especial a Jesús González, toda una vida dedicada a la ciencia.

No me puedo olvidar de nuestros “almacenes de emergencia”, gracias por ponernos siempre una sonrisa y sacarnos de apuros, a Vero y Juanan (mucha suerte a los dos en la nueva etapa os lo merecéis), a Dani (“el travieso”, sigue así que estás hecho un pieza), a Luis (eres un valiente por meterte en la jungla con bici), a Irene, Juanjo, Nando, Marina, Bárbara, Fernando, Gloria, Bea...

A los cirujanos César y Alejandro, a la gente del animalario, a Curra (a pesar del frío de ahí abajo, que buenos ratos hemos pasado), a Encarna, a Isabel, a Flor, a Carmen (maaala!!) y a toda la gente que de una u otra manera nos hacen el trabajo más fácil, muchas gracias y perdón si me he olvidado de alguien.

A todos mis amigos por estar ahí, siempre apoyándome y dándome fuerzas, aunque soy consciente de que la mayoría de las veces ni me entendíais. A mis chicas de la facul, Ali, Bea y Bego, que aunque nos cueste vernos, siempre disfrutamos cuando estamos juntas.

A las “Cesma girls and boy”: Almu, y Raúl, quien nos iba a decir que esto iba a seguir siete años y los que quedan????, es un placer formar parte de vuestras vidas, me encantan esas tardes tapeando y paseando por Madrid, intentando arreglar el mundo, siempre aprendo con vosotros. Helen, ánimo guapa, que de aquí a nada ya tendrás a Nicolás contigo y ni te acordarás de todo lo que estás pasando.

A mis chic@s de la resi, a Vane y Juanjo (vaya cambio de vida en unos mesecitos eh?, ánimo que lo vais a hacer genial), a Ana y Fer (los superpapis, vaya nene más bueno que tenéis), a Bego e Ignacio (cuando nos vamos de despedida????). A Teresa y Juan, gracias por sacarme de los “embolaos” en los que me meto con el ordenador y mucha suerte con el examen!!!.

A Bi, vale, lo siento, Bianca, eres genial y conseguirás todo lo que te propongas. A Carmen y Pepe, espero que no se demore más la visita, ya no hay excusa. Muchas gracias por tener siempre vuestra puerta abierta y hacernos sentir como en casa. A Silvia y David, siempre ha habido tiempos mejores. A Nuria, no te agobies con el piso, trabajo, salir,....relájate y vive.

También quiero agradecer a Angel, Maribel, Aida, Kenny y Luisa toda la paciencia, apoyo y cariño que me han demostrado, gracias por hacerme sentir parte de esa gran familia. No me olvido de la pequeña colorico, Sofía, toda una guiri, que según su tío será una artista del flamenco, o no????.

A mis abuelos: Jesús y Ángela, espero poder seguir disfrutando de vosotros por muchos años, sois maravillosos, y Félix y Guadalupe (que empeño ponían en intentar entender lo que hacía, siempre estaréis en mis recuerdos).

No me he olvidado de vosotros, esta tesis es tan vuestra como mía, Mamá, Papá, no lo podías haber hecho mejor, sois unos padres de campeonato, sin vuestro apoyo, paciencia, ayuda y comprensión, hoy no estaría aquí. Gracias por dejarme siempre la libertad de decidir, sois lo mejor

que tengo. A mi hermano, José, siempre vas a ser el peque, gracias por estar en todo momento a mi lado, por todas las risas y los buenos ratos que pasamos juntos, espero que nunca se acaben.

A Ángel, gracias por tu paciencia, por tu eterna sonrisa, por tu apoyo incondicional y por estar siempre a mi lado. Esta tesis es para tí, porque me haces la persona más feliz del mundo. Gracias por aparecer en mi vida, gracias por ser, gracias por estar. Y como siempre, “nada de nada”.

MUCHAS GRACIAS!!!!!!

Eva



La aterosclerosis es la mayor causa de muerte en los países desarrollados. En muchos casos, la primera manifestación de la enfermedad es un evento vascular agudo, mientras que en otras muchas ocasiones, la enfermedad no se manifiesta, y son exámenes médicos los que la ponen de manifiesto. En esta tesis, hemos estudiado la implicación de las rutas COX-2 y 5-LO en los procesos aterotrombóticos agudos, en pacientes con síndrome coronario agudo sin elevación del segmento ST (SCASEST) y crónicos (Aterosclerosis carotídea). En la primera parte hemos observado que pacientes con SCASEST muestran a nivel sistémico, mayor activación del factor nuclear NF- $\kappa$ B, niveles más elevados de PGE<sub>2</sub> y LTB<sub>4</sub> y mayor actividad gelatinolítica de la MMP-9, que los sujetos sanos. El tratamiento precoz e intensivo con 80mg/día de atorvastatina durante 2 meses normalizó los valores de PGE<sub>2</sub> y MMP-9 respecto al tratamiento moderado. La segunda parte de esta tesis se ha dedicado a la caracterización de la vía de la 5-LO y los receptores BLT1 y BLT2 en pacientes con aterosclerosis carotídea. Estos pacientes muestran una sobreexpresión génica de 5-LO, FLAP, LTA4H, BLT1 y BLT2 en las células mononucleares periféricas (PBMCs) y esto se refleja en un aumento de los niveles plasmáticos de LTB<sub>4</sub> respecto a lo observado en individuos sanos. Las placas ateroscleróticas presentan un incremento en la expresión de 5-LO, LTA4H y BLT1 en la zona de los hombros respecto de la cápsula. Estas proteínas, junto con FLAP y BLT2, son expresadas por los macrófagos y células de músculo liso vascular presentes en las placas, y colocalizan con el factor nuclear NF- $\kappa$ B activo en ellas. Finalmente, analizamos la señalización intracelular inducida por LTB<sub>4</sub> en monocitos en cultivo. Observamos que LTB<sub>4</sub> a través de la unión a sus dos receptores, BLT1 y BLT2, activa las quinasas ERK, JNK y AKT y éstas el factor nuclear NF- $\kappa$ B, que incrementa la expresión de genes proinflamatorios como IL-6, MCP-1 y TNF- $\alpha$ . Además, LTB<sub>4</sub> activa su propia ruta de síntesis –posiblemente mediante un mecanismo de retroalimentación positiva- potenciando la inflamación. En conjunto, estos datos abren nuevas vías de investigación para el desarrollo de estrategias terapéuticas en la aterotrombosis relacionadas con las rutas de la COX-2 y la 5-LO.

## Summary

---

Atherosclerosis is the major cause of death in developed countries. In many cases, the first manifestation is an acute syndrome, while in other cases, the disease evolves subclinically and a medical checkup is necessary for the diagnosis. In this thesis, we have studied the COX-2 and the 5-LO pathways and their implication in acute [patients with non ST elevation acute coronary syndrome (NSTEMI)] and chronic (Carotid atherosclerosis) atherothrombosis. Firstly, we found that patients with NSTEMI, display a significant increase in NF- $\kappa$ B activity, PGE<sub>2</sub>, and LTB<sub>4</sub> levels and MMP-9 activity in their blood as compared to healthy controls. The early and intensive treatment with atorvastatin 80 mg/day for 2 months normalized circulating PGE<sub>2</sub> levels and MMP-9 activity with respect to conventional therapy. In the second part of this thesis, we have studied the 5-LO pathway and BLT1 and BLT2 receptors expression in patients with carotid atherosclerosis. Our results show that these patients display a significant increase of 5-LO, FLAP, LTA4H, BLT1 and BLT2 mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and consequently we found an increase in LTB<sub>4</sub> plasma levels in relation to healthy controls. Moreover, we observed a significant overexpression of 5-LO, LTA4-H and BLT1 in the shoulder as compared to the cap of the atherosclerotic lesions. These proteins together with FLAP and BLT2 are expressed by macrophages and vascular smooth muscle cells that are present in the plaques. Furthermore, 5-LO, FLAP, LTA4H, BLT1 and BLT2 proteins are colocalized with active NF- $\kappa$ B *in vivo*. Finally, we analyzed the intracellular signaling induced by LTB<sub>4</sub> in cultured monocytic cells. The data showed that LTB<sub>4</sub> via BLT1 and BLT2 activated ERK, JNK, AKT and NF- $\kappa$ B and consequently induced IL-6, MCP-1 and TNF- $\alpha$  gene expression. Furthermore, LTB<sub>4</sub> also activated 5-LO pathway –possibly through a positive feedback mechanism- that increased the inflammatory state. In conclusion, these data open new evidences for the development of therapeutic strategies related to the COX-2 and 5-LO pathways.

<b>Abreviaturas.....</b>	<b>5</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>8</b>
<b>1.-ATEROSCLEROSIS .....</b>	<b>9</b>
1.1.- Disfunción endotelial .....	10
1.2.- Progresión de la lesión.....	11
1.3.- Rotura de la placa .....	12
<b>2.- SINDROME CORONARIO AGUDO .....</b>	<b>13</b>
2.1.- Manifestaciones Clínicas.....	13
2.2.- Tratamiento y Prevención .....	13
<b>3.- MEDIADORES INFLAMATORIOS IMPLICADOS EN LA PATOGENIA</b>	
<b>ATEROMATOSA .....</b>	<b>14</b>
3.1.- Citoquinas .....	14
3.2.- Quimioquinas .....	14
3.3.- Metaloproteinasas .....	15
3.4.- Factor de Transcripción NF- $\kappa$ B .....	15
3.4.1.- La familia I $\kappa$ B.....	16
3.4.2.- Activación de NF- $\kappa$ B.....	16
3.5.- Metabolismo del Acido Araquidónico .....	17
3.5.1.-Ruta de la COX/PGE2.....	17
3.5.2.- La Prostaglandina E-2.....	18
3.5.3.- Implicación de la via COX-2/PGE2 en la patogenia aterosclerótica.....	19
3.5.4.- Ruta de la 5-LO/LTB4.....	19
3.5.5.- El Leucotrieno B4 (LTB4) .....	20
3.5.6.- Implicación de la ruta 5-LO/LTB4 en la patología aterosclerótica .....	21
<b>4.- SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR .....</b>	<b>21</b>
4.1.- Cascadas de las proteínas activadas por mitógenos .....	21
4.1.1.- Cascada de la MAPK ERK1/2 .....	22
4.1.2.- Cascada de la MAPK p38 .....	22
4.1.3.- Cascada de la MAPK JNK.....	23
4.2.- Cascada de la PI3 quinasa/AKT .....	23
<b>5.- MODULACIÓN FARMACOLÓGICA DE LA RUTA DEL ACIDO ARAQUIDÓNICO EN</b>	
<b>ATEROSCLEROSIS .....</b>	<b>24</b>
5.1.- Vía COX2/PGE2.....	24
5.2.- Vía 5-LO/LTB4 .....	25
5.3.-Estatinas.....	25

4.3.1.- Estatinas y aterosclerosis.....	26
<b>II. OBJETIVOS .....</b>	<b>30</b>
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>32</b>
1- ESTUDIOS <i>In vivo</i> .....	32
1.1.- Diseño del estudio en pacientes con SCASEST .....	32
1.2.- Diseño del estudio en pacientes con aterosclerosis carotídea .....	34
1.3.- Procesamiento de las muestras .....	35
1.3.1.- Muestras para análisis histológico.....	35
1.3.2.- Aislamiento de las PBMCs .....	36
1.3.3.- Aislamiento del plasma.....	36
2. ESTUDIOS <i>In vitro</i> .....	36
2.1.- Línea de células monocíticas humanas .....	36
3. TÉCNICAS EMPLEADAS.....	37
3.1.-Inmunohistoquímica .....	37
3.2.-Southwestern in situ .....	38
3.3.- Cuantificación Histológica .....	39
3.4.- ELISA .....	39
3.5.- Ensayos de retardo de movilidad electroforética EMSA .....	40
3.5.1.- Extracción de proteínas nucleares .....	40
3.5.2.- Marcaje del oligonucleótido consenso.....	40
3.5.3.- Ensayo de unión.....	41
3.6.- Extracción y medida de la calidad-pureza del RNA .....	41
3.6.1.- Análisis por PCR a tiempo real.....	41
3.7.- Western blot .....	42
3.8.- Inmunofluorescencia .....	43
3.9.- Zimografías .....	44
4.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	44
<b>IV. RESULTADOS.....</b>	<b>45</b>
<b>Parte I. Mediadores inflamatorios y modulación terapéutica en pacientes con SCASEST.....</b>	<b>46</b>
1.- Características clínicas de los pacientes con SCASEST.....	47
2.- Perfil lipídico de los pacientes incluidos en nuestro estudio .....	49
3.- El tratamiento intensivo con atorvastatina disminuye la activación del factor nuclear NF- $\kappa$ B en pacientes con SCASEST .....	50

4.-El tratamiento con altas dosis de atorvastatina disminuye los niveles plasmáticos de PGE2 en pacientes con SCASEST .....	51
5.- La atorvastatina inhibe la actividad proteolítica de la MMP-9 en pacientes con SCASEST .....	53
6.- El tratamiento intensivo con atorvastatina no modula los niveles circulantes de LTB4 en pacientes con SCASEST .....	55
<b>Parte II. Implicación de la Vía 5-LO/LTB4 en el desarrollo de la aterosclerosis .....</b>	<b>57</b>
<b>ESTUDIOS <i>In vivo</i>.....</b>	<b>58</b>
1.- Diseño del estudio y características clínicas de los pacientes .....	58
2.- Estudios a nivel sistémico en pacientes con aterosclerosis carotídea .....	59
2.1.-Expresión génica del sistema 5-LO/LTB4 y de los receptores BLT1 y BLT2 en las PBMCs de pacientes con aterosclerosis carotídea. ....	59
2.2.-Niveles circulantes de LTB4 .....	60
3.- Análisis histológico de las placas ateroscleróticas humanas .....	62
3.1.-Expresión de la ruta 5-LO/LTA4H en las placas carotídeas humanas.....	62
3.2.-Expresión de los receptores BLT1 y BLT2 en las placas carotídeas humanas .....	63
3.3.- Localización de la expresión de 5-LO, FLAP, LTA4-H y los receptores BLT1 y BLT2 en placas carotídeas humanas .....	64
3.4.-Colocalización de las proteínas de la ruta 5-LO/LTB4 y los receptores BLT1 y BLT2 con el factor de transcripción NF- $\kappa$ B en placas ateroscleróticas humanas .....	66
<b>ESTUDIOS <i>In vitro</i> .....</b>	<b>68</b>
1.- LTB4 activa NF- $\kappa$ B en células monocíticas U-937 .....	68
1.1.- LTB4 activa NF- $\kappa$ B vía BLT1 y BLT2 .....	72
2.- Mecanismos de activación de NF- $\kappa$ B en respuesta a LTB4 .....	74
3.- LTB4 induce la expresión de genes proinflamatorios en monocitos .....	78
3.1.- LTB4 modula la expresión génica de IL-6, MCP-1 y TNF- $\alpha$ vía BLT1 y BLT2 en monocitos humanos .....	79
3.2.- La inhibición de las rutas de MAPK y de NF- $\kappa$ B modula la expresión génica inducida por LTB4 en monocitos humanos. ....	80
4.- La inhibición de la ruta 5-LO/LTA4H modula la activación de la ruta de las MAPKs y de NF- $\kappa$ B inducida por LTB4 en monocitos humanos .....	84
5.- La inhibición de la ruta 5-LO/LTA4H modula la activación génica de IL-6, MCP-1 y TNF- $\alpha$ inducida por LTB4 en monocitos humanos.....	86
<b>V. DISCUSIÓN.....</b>	<b>89</b>

1.- CARACTERIZACIÓN DE MEDIADORES INFLAMATORIOS EN PACIENTES CON SCASEST.....	90
2.- MODULACIÓN TERAPEÚTICA EN PACIENTES CON SCASEST.....	93
3.- IMPLICACIÓN DE LA VÍA 5-LO/LTB4 EN LA PATOLOGÍA ATEROSCLERÓTICA..	100
<b>VI. CONCLUSIONES.....</b>	<b>109</b>
<b>VII BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>110</b>
<b>VIII. ANEXO.....</b>	<b>130</b>

## Abreviaturas:

En muchos casos se ha conservado la correspondiente abreviatura en inglés debido a su frecuente utilización en el lenguaje científico.

5-LO	5- lipoxigenasa
5-HETE	Ácido 5 hydroxyeicosatetraenoico
AA	Ácido araquidónico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
AINEs	Antiinflamatorios no esteroideos
ANOVA	Análisis de la varianza entre grupos
ApoE	Apoproteína E
ARAI	Antagonistas de los receptores AT1 de la angiotensina II
ARN	Ácido ribonucleico
ATP	Adenosina trifosfato
ATV	Atorvastatina
BLT1	Receptor 1 de LTB4 ó receptor de alta afinidad de LTB4
BLT2	Receptor 2 de LTB4 ó receptor de baja afinidad de LTB4
BSA	Albúmina de suero bovino
CCR2	Receptor de MCP-1
CD40L	CD40 ligando
CLASS	Celecoxib Long-term Arthritis Safety Study
CMLV	Células de músculo liso vascular
COX-2	Ciclooxigenasa 2
COX-1	Ciclooxigenasa 1
CT	Colesterol total
CRP	Proteína C reactiva
CXC	Quimioquinas
DAB	Diaminobenzidina
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
EEM	Error estándar de la media
ELISA	Corresponde a las siglas: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EMSA	Ensayo de retardo de movilidad electroforética
eNOS	Sintasa de óxido nítrico endotelial
EP	Receptores de membrana de PGE <sub>2</sub>
ERK	Quinasa regulada por señales extracelulares
FITC	Isotiocianato de Fluoresceína

FLAP	Proteína activadora de la 5-LOX
G3PDH	Gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa
HDL	Lipoproteína de alta densidad
HCl	Ácido clorhídrico
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrógeno
HMG-CoA	3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A
HEPES	Ácido N-[2-hidroxietil] piperazina-N'-[2-etanosulfónico]
IAM	Infarto agudo de miocardio
ICAM-1	Molécula de adhesión intercelular 1
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
I $\kappa$ B	Subunidad inhibitoria $\kappa$ B
IECA	Inhibidores de la enzima convertidora de Angiotensina II
IL	Interleuquina
IMT	Relación íntima/media
JNK	Quinasa amino terminal c-jun
KCl	Cloruro potásico
LDL	Lipoproteína de baja densidad
LDLox	Lipoproteína de baja densidad oxidada
LTA4H	Leucotrieno A-4 hidrolasa
LTA4	Leucotrieno A-4
LTB4	Leucotrieno B4
MAPKs	Proteínas quinasas activadas por mitógeno
MCP-1	Proteína quimioattractante de monocitos
MK	Quinasa activada por MAPKs
MMPs	Metaloproteinasas
NF- $\kappa$ B	Factor nuclear de transcripción $\kappa$ B
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintasa
PBMC	Células mononucleares de sangre periférica
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Proteína C Reactiva
PDTC	Pirrolidin-ditiocarbamato
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandina E <sub>2</sub>
PGES	Prostaglandina E sintasa
PGHS	Prostaglandina endoperóxido sintasa
PGI <sub>2</sub>	Prostaciclina
PI	Fosfatidil inositol
PI3K	Fosfatidil inositol 3 quinasa
PLA <sub>2</sub>	Fosfolipasa A <sub>2</sub>

PLC	Fosfolipasa C
PMSF	Fluoruro de fenilmetanosulfonilo
REDOX	Reacciones de óxido-reducción
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RPMI	Corresponde a las siglas: Rapid Prototyping and Manufacturing Institute
SBF	Suero bovino fetal
SCA	Síndrome coronario agudo
SCASEST	Síndrome coronario agudo sin elevación del segmento ST
TC	Tratamiento convencional
TG	Triglicéridos
TGF $\beta$	Factor transformador del crecimiento
TIMP	Inhibidor tisular de las MMPs
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral- $\alpha$
T $_x$ A $_2$	Tromboxano A $_2$
UDA	Unidades arbitrarias de densitometrado
VCAM	Molécula de adhesión de células vasculares
VIGOR	Vioxx Gastrointestinal Outcomes Research Study
VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad

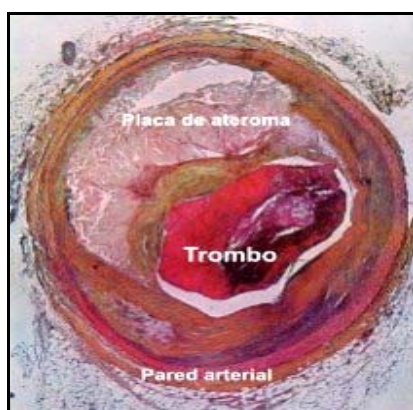


# Introducción

## 1.- ATEROSCLEROSIS

Las enfermedades cardiovasculares son en la actualidad la principal causa de enfermedad y muerte en los países desarrollados. Dentro de este grupo, la más importante en el mundo occidental es la aterosclerosis, siendo ésta la principal causa de muerte en la población europea<sup>80,113</sup>. La aterosclerosis es una enfermedad progresiva cuyo origen se debe la combinación de múltiples factores. Se caracteriza por la acumulación de lípidos y elementos fibróticos en las arterias de nuestro organismo. Comienza de forma temprana, ya durante la juventud, y se desarrolla de forma asintomática y/o sintomática a lo largo de la vida del adulto. Es importante señalar, que la aterosclerosis es una enfermedad de tipo sistémico, que afecta a la totalidad de los vasos sanguíneos y a cada una de las capas que los forman, íntima, media y adventicia.

Hace treinta años, se entendía la aterosclerosis como una simple acumulación de lípidos en las paredes arteriales que con el paso del tiempo impedía el suministro sanguíneo a los tejidos dando lugar al infarto agudo de miocardio (IAM) o a los accidentes cerebrovasculares (ictus). El emergente conocimiento de la biología vascular dirigió la investigación desde los factores de crecimiento y la proliferación de las CMLV hasta el prominente papel que desempeña la inflamación y la respuesta inmune en el desarrollo de la misma<sup>80,113</sup>. Los eventos cardiovasculares raramente son debidos al crecimiento de la placa, más a menudo son el resultado de la ruptura de la misma con la formación del coágulo o trombo que ocluye bruscamente la arteria. En la actualidad, la teoría más apoyada afirma que este proceso patológico se inicia con la disfunción y daño endotelial, tras el cual, se origina una respuesta inflamatoria y fibroproliferativa, que conduce a la aparición de la lesión vascular. Esta lesión también llamada placa de ateroma, está constituida característicamente por un núcleo lipídico rodeado de una capa fibrótica formada principalmente por CMLV y colágeno (Figura 1). Aunque el proceso comienza en el endotelio, su progresión afecta al resto de las capas de la pared vascular. Finalmente, el proceso concluye con la rotura de la placa y posterior trombosis. Todo este fenómeno se compone de diferentes etapas: disfunción endotelial, reclutamiento de células inflamatorias, proliferación de células de músculo liso vascular (CMLV) con producción de matriz extracelular y formación de la cápsula fibrosa y trombosis de la placa de ateroma.



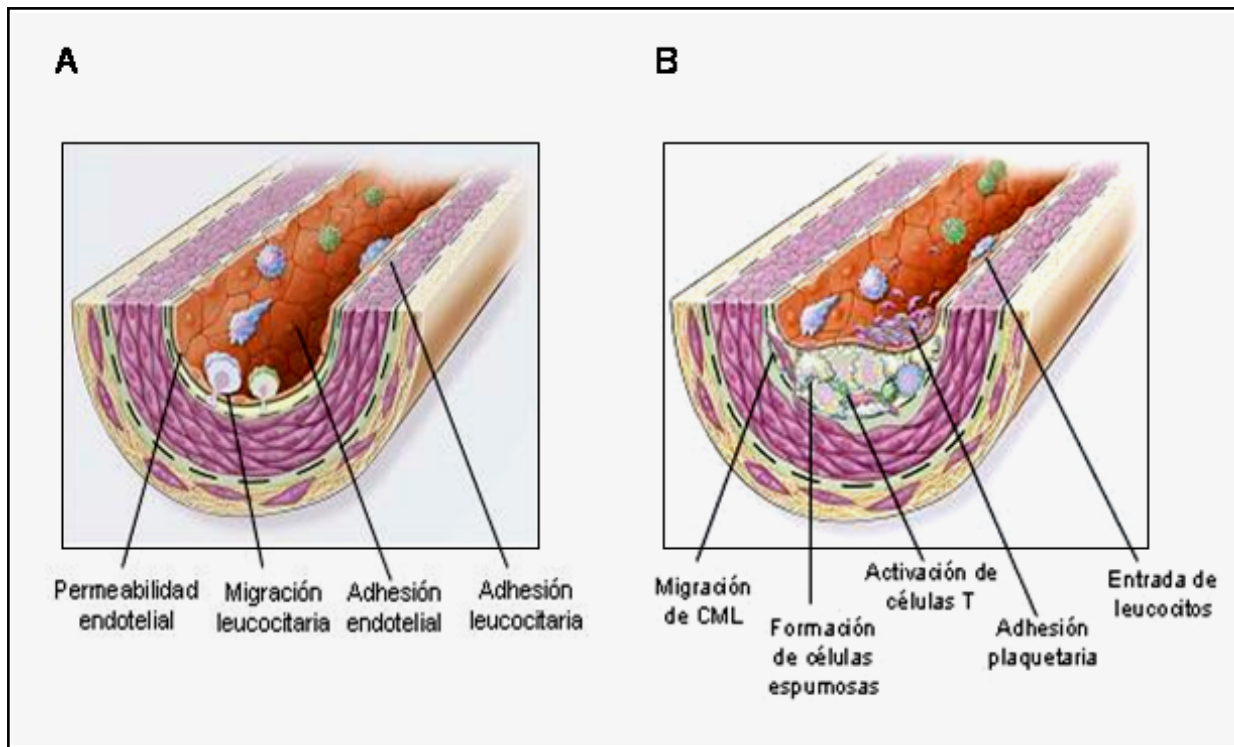
**Figura 1. Arteria con placa aterosclerótica y trombo**

### 1.1.- Disfunción endotelial

El término disfunción endotelial ha sido usado para referirse a diversas condiciones patológicas, tales como inflamación, alteraciones en la coagulación sanguínea, modulación y remodelación del crecimiento vascular<sup>71</sup>. Sin embargo, en gran parte de la literatura este término se ha utilizado para referirse a un deterioro en el tono vasomotor endotelial causado principalmente por una pérdida de óxido nítrico (NO) en la pared del vaso<sup>81,202</sup>.

Entre los factores de riesgo cardiovascular asociados a la disfunción endotelial, cabe destacar: la hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia, el tabaquismo, la hipertensión y la diabetes<sup>19,81,96,131</sup>. Existe además, una predisposición genética, habiéndose demostrado que los hijos de sujetos que han sufrido un IAM previo presentan más disfunción endotelial y engrosamiento intimal<sup>67</sup>, y que éste último también está presente en niños con hipercolesterolemia familiar. Todos estos factores de riesgo junto con la predisposición genética pueden conducir a la alteración en el patrón de expresión y liberación de factores vasoactivos por parte del endotelio, lo que conduce a la alteración drástica de sus funciones.

En las primeras fases de la aterosclerosis, la acumulación de lípidos juega un papel fundamental. De hecho, cuando existe disfunción endotelial, el aumento de la permeabilidad vascular hace que la cantidad de lipoproteínas de baja densidad (LDL) que entra en la pared arterial exceda la capacidad de transporte invertido del colesterol para devolverla a la sangre. Este hecho, junto con la existencia de los factores de riesgo antes mencionados, hace que se reduzcan los niveles de lipoproteínas de alta densidad (HDL), lo que dificulta aún más el transporte invertido de colesterol<sup>129</sup>, de modo que las LDL permanecen más tiempo en el espacio subendotelial<sup>31,186</sup>, incrementando la probabilidad de oxidación por los radicales de oxígeno sintetizados por las células endoteliales, macrófagos y CMLV, dando lugar a las LDL-oxidadas (LDLox)<sup>137</sup>. Estas LDLox activan el endotelio<sup>152</sup>, estimulan la expresión de moléculas de adhesión<sup>193</sup> y la secreción de factores quimioatrayentes, como la proteína quimiotáctica para monocitos (MCP-1)<sup>47</sup>, o el leucotrieno B4 (LTB4)<sup>4,199</sup>, que incrementan la migración de las células mononucleares circulantes, monocitos y CMLV hacia la íntima<sup>35</sup> (Figura 2A), donde se activan y diferencian a macrófagos. Las LDLox son capturadas por los receptores basurero o “scavengers” de los macrófagos y CMLV<sup>175</sup>. Estos receptores, al no estar regulados por el contenido de colesterol intracelular, dan lugar a una sobrecarga de lípidos en esas células formándose “las células espumosas”<sup>133</sup>, que finalmente mueren y liberan los lípidos de su interior, con los que formarán el núcleo ateromatoso (estría grasa) y las sustancias tóxicas, como enzimas, radicales y aniones superóxido. Estos productos lesionan el endotelio, que pasará de ser disfuncionante a tener daños morfológicos e incluso en algunas áreas quedará destruido (Figura 2B). En este sentido, en los últimos años se ha sugerido que en la sangre circulan células progenitoras endoteliales que, pueden reparar el daño endotelial<sup>200,211</sup>. El número de estas células disminuye proporcionalmente a la presencia de factores de riesgo coronario<sup>59,200</sup> y es aumentado por terapias efectivas contra esta patología, como las estatinas<sup>196</sup>.

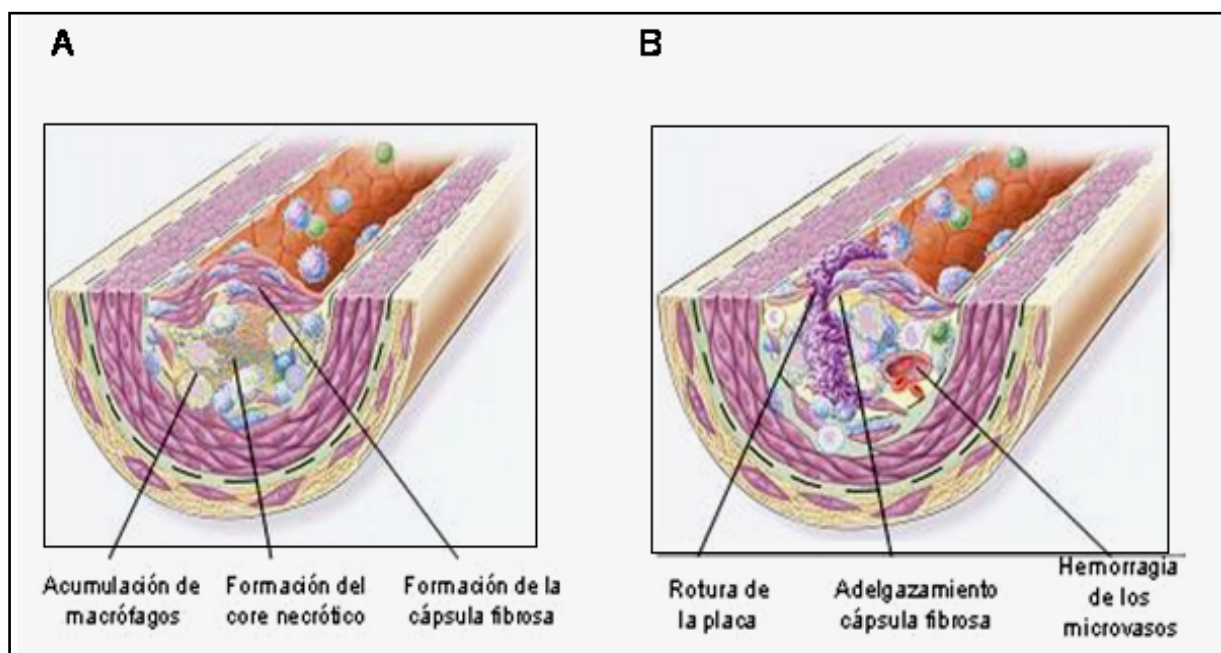


**Figura 2.- Disfunción endotelial (A) y formación de la estría grasa (B) en la patogénesis de la aterosclerosis.** (Ross R<sup>161</sup>).

## 1.2.- Progresión de la lesión

La continua acumulación de lípidos, productos liberados por los macrófagos y radicales libres de oxígeno, da lugar a un mayor daño endotelial acompañado además por citolisis. Por otro lado, las plaquetas, monocitos y células endoteliales liberan factores mitogénicos que estimulan la migración, proliferación y síntesis de matriz extracelular por parte de las CMLV. Todo ello da lugar a que la lesión progrese hacia una placa madura<sup>80,111,161</sup>.

Las CMLV de la lesión ateromatosa muestran un fenotipo diferente a las normales, con mayor presencia de órganos secretores como el retículo endoplásmico y un menor número de fibras contráctiles<sup>5</sup>. Estas células liberan también factores de crecimiento, proliferan y producen matriz extracelular que junto con las CMLV forman la denominada cápsula fibrosa<sup>142,189</sup>. Durante este proceso la placa forma microvasos en respuesta a factores angiogénicos, que aumentan la superficie de contacto con la sangre, pudiendo reclutarse más células inflamatorias; además, realizan una función nutritiva, favoreciendo el crecimiento de la placa<sup>111</sup>. Estos microvasos pueden ser el origen de trombosis y hemorragias *in situ*<sup>111</sup> (Figura 3A).



**Figura 3.- Transformación de una estría grasa a placa complicada (A) y Rotura de la misma (B)** (Ross R<sup>161</sup>).

### 1.3.- Rotura de la placa

La presencia de un proceso inmune e inflamatorio en la placa aterosclerótica, es un mecanismo decisivo que conduce a la desestabilización, rotura y la subsiguiente formación de un trombo, que es la base de las consecuencias clínicas más graves de la aterosclerosis.

La pérdida de CMLV, posiblemente por apoptosis<sup>70</sup> junto con la liberación de factores proinflamatorios y metaloproteinasas por parte de los macrófagos conduce a la reducción de la síntesis de colágeno y a la degradación de la cápsula<sup>55,110</sup>. Este desequilibrio entre síntesis y degradación de colágeno debilita la placa y la hace vulnerable, muy predispuesta a la rotura. Cuando esto se produce, el núcleo lipídico rico en factor tisular procedente de los macrófagos, se pone en contacto con la sangre, lo que desencadena la trombosis<sup>62,185</sup>.

En la rotura de la placa también es importante el papel que juegan los lípidos. La hipercolesterolemia está asociada con hipercoagulabilidad y con un aumento de la reactividad de las plaquetas en la zona de la lesión vascular<sup>15</sup>. Además, las LDLox inhiben la actividad de la óxido nítrico sintasa (NOS), promoviendo la agregación plaquetaria y consecuente formación de trombos<sup>37</sup>. En este sentido, la mayoría de los episodios vasculares agudos, como el IAM y la angina inestable, se producen por trombosis en zonas de daño endotelial o en placas inestables<sup>61</sup>.

Existen, además, otros factores físicos que favorecen la rotura de la placa como, por ejemplo, la presión arterial, el diámetro de la arteria y el impacto de la sangre sobre la placa. También es importante el grosor de la cápsula fibrosa. Así, las placas que poseen un núcleo lipídico grande, una cápsula fibrosa fina y bajo contenido en colágeno, son las denominadas "placas vulnerables"<sup>124</sup>. En

consecuencia, todo aquello que conduzca a la reducción de colágeno, o de las CMLV que lo sintetizan, debilita la cápsula, haciéndola más propensa a la rotura (Figura 3B). Aparte, de las “placas vulnerables”, existe la llamada “sangre vulnerable”, que es la propensa a formar trombos. Uniendo ambos conceptos, surge lo que se denomina “paciente vulnerable”, que es aquel sujeto que posee “placas vulnerables” y “sangre vulnerable”.

## 2.- SÍNDROME CORONARIO AGUDO

### 2.1.- Manifestaciones Clínicas

El término síndrome coronario agudo se refiere a una situación clínica en la que se produce una isquemia miocárdica, en situaciones de reposo o de pequeños esfuerzos. A diferencia de la angina estable, donde el problema es una lesión aterosclerótica en las arterias coronarias que no permite el paso de más sangre a su través en respuesta al esfuerzo, en el síndrome coronario agudo (SCA) se produce una interrupción del flujo por una trombosis de la placa aterosclerótica. Hay dos grandes tipos de SCA: los que cursan sin elevación del segmento ST en el electrocardiograma (**SCASEST**) y los que sí la presentan (**SCACEST**)<sup>33,171</sup>.

Los SCACEST, a los que nos referimos habitualmente como IAM, se deben a una oclusión total de una arteria coronaria por el trombo. El proceso isquémico, y los síntomas que ocasiona, suelen ser continuos, además de ser clave el tiempo de evolución, ya que la necrosis va progresando, de modo que cuanto antes se restaure el flujo, menor será la cantidad de miocardio dañado<sup>33</sup>.

En el caso del SCASEST no existe una ausencia total y permanente de flujo sanguíneo, sino que el miocardio recibe oxígeno bien porque la oclusión trombótica es incompleta o porque existe circulación colateral<sup>72,204</sup>. Los pacientes con SCASEST pueden evolucionar de dos maneras: por un lado, habrá algunos que no mostrarán datos de necrosis miocárdica, es decir, los niveles de troponina I o T en plasma no se elevarán. Este cuadro se denomina angina inestable. En cambio si se produce aumento de los niveles plasmáticos de estas enzimas, se tratará de un IAM sin onda Q, así denominado porque, a diferencia del IAM clásico, no aparece dicha onda en el electrocardiograma, que es indicadora de una necrosis importante<sup>22</sup>.

### 2.2.- Tratamiento y Prevención

El objetivo principal del tratamiento para los pacientes con SCA es restaurar el flujo sanguíneo normal lo más rápidamente posible. Los fármacos antitrombóticos –ya sean antiplaquetarios o anticoagulantes– son parte fundamental del tratamiento farmacológico del SCA al tratar los coágulos existentes e impedir la formación de nuevos<sup>72,171,204</sup>.

Dependiendo de las características clínicas del paciente y de su anatomía coronaria será tratado con medicamentos o con planteamientos invasivos, como la angioplastia –comúnmente con stent– o con un bypass aorto-coronario, procedimiento en el que los cirujanos puentean la arteria afectada.

Los tratamientos farmacológicos empleados son similares para los pacientes con angina inestable y con IAM. Se les administran fármacos para aliviar los síntomas: nitroglicerina; medicamentos de acción antitrombótica: antiplaquetarios (aspirina, clopidogrel e inhibidores de la glucoproteína IIb/IIIa); anticoagulantes (heparina) y medicamentos para disminuir la mortalidad y los acontecimientos recidivantes: agentes betabloqueantes, inhibidores de la enzima de conversión de la angiotensina (IECAs), antagonistas de los receptores AT1 de angiotensina II (ARAI) y estatinas<sup>58,72,171,204</sup>.

### 3.- MEDIADORES INFLAMATORIOS IMPLICADOS EN LA PATOGENIA ATEROMATOSA

#### 3.1.- Citoquinas

Las citoquinas participan activamente en el proceso inflamatorio favoreciendo la activación, proliferación y migración celular a través de sus receptores de membrana. A nivel fisiológico, participan en la homeostasis y en la reparación del tejido dañado, pero su producción excesiva conduce a situaciones patológicas, de ahí su implicación en enfermedades inflamatorias, inmunes e infecciosas<sup>182</sup>.

Las citoquinas son generalmente clasificadas según su actividad proinflamatoria: [factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleucina 6 (IL-6), interferón  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )] o antiinflamatoria [(interleucina 4 (IL-4), interleucina 10 (IL-10) y factor transformador del crecimiento (TGF- $\beta$ )]. El equilibrio entre ambas podría ser importante, tanto en el inicio como en la progresión de la placa aterosclerótica<sup>112,182</sup>, ya que favorecen la migración de células mononucleares a la zona de la lesión mediante la regulación de la expresión de MCP-1 y de moléculas de adhesión<sup>12,182</sup>. Durante la progresión de la lesión aterosclerótica son liberadas tanto por las células espumosas como por el endotelio dañado, demostrándose que citoquinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  estimulan a los macrófagos y células residentes produciendo factores de crecimiento que inducen la proliferación de CMLV, favoreciendo así el crecimiento de las placas<sup>161</sup>.

#### 3.2.- Quimioquinas

Las quimioquinas son citoquinas quimioatrayentes que tienen un papel crucial en el reclutamiento, adhesión y entrada de células inflamatorias en la pared vascular. Se distinguen dos subfamilias, la CXC (reclutan neutrófilos) y la CC (reclutan monocitos), cuyos principales representantes son la interleucina 8 (IL-8) y el MCP-1, respectivamente<sup>168</sup>. El MCP-1 es una quimioquina de amplio espectro de actividad, con potente capacidad quimiotáctica para monocitos y linfocitos T, que además induce en monocitos la expresión de integrinas favoreciendo su migración<sup>91</sup>. Su expresión está incrementada en células del endotelio vascular, CMLV y macrófagos tanto *in vitro* como en placas ateroscleróticas humanas y de conejo<sup>209</sup>. Además, se ha demostrado que la



sobreexpresión de MCP-1 en macrófagos de ratones deficientes en la apolipoproteína E (ApoE<sup>-/-</sup>) incrementa la progresión de la lesión aterosclerótica<sup>155</sup>.

### 3.3.- Metaloproteinasas

Las metaloproteinasas (MMPs) son una familia de endopeptidasas dependientes de Zn<sup>2+</sup>, capaces de degradar componentes de la matriz extracelular. Participan en procesos fisiológicos como el desarrollo embrionario, la migración celular, la cicatrización de heridas y la reabsorción de tejido. Sin embargo, una desregulación o activación de la expresión de MMPs conduce a situaciones patológicas, como enfermedades reumáticas, metástasis tumoral, remodelación vascular y cardíaca y rotura de la placa aterosclerótica en síndromes coronarios agudos<sup>92,93,104</sup>.

La familia de las MMPs puede englobarse en 6 subfamilias diferentes dependiendo del tipo de sustrato: **colagenasas** (MMP1, MMP8 y MMP13), **gelatinasas** (MMP2 y MMP9), **estromielisinas** (MMP3, MMP10 y MMP11), **matrilisinas** (MMP7), **metaloelastasas** (MMP12) y **metaloproteinasas de membrana** (MT-MMP1, MT-MMP2, MT-MMP3 y MT-MMP4)<sup>92,93</sup>.

La actividad de las MMPs está regulada a nivel transcripcional, secretándose como zimógeno o forma inactiva, y requiere activación por proteólisis. Por otro lado está regulada por los inhibidores específicos de tejido de las MMPs (TIMPs). El incremento de su transcripción génica así como de su actividad catalítica y la reducción en la actividad de los TIMPs puede aumentar la proteólisis de la matriz extracelular, individual o conjuntamente<sup>68,87</sup>.

La actividad de MMPs puede ser incrementada por citoquinas proinflamatorias, hormonas y factores de crecimiento<sup>55,92</sup>. Esta activación disminuye el volumen de la placa aterosclerótica por degradación de la matriz extracelular, haciendo a las lesiones más vulnerables a la rotura<sup>11</sup>. Por este hecho se les ha implicado en los SCA<sup>44</sup>. El efecto neto de la actividad de las metaloproteinasas en la aterosclerosis no es del todo claro, siendo necesarias más investigaciones para un mayor conocimiento de su papel en las patologías vasculares.

### 3.4.- Factor de Transcripción NF-κB

La presencia del factor nuclear NF-κB ha sido descrita en numerosos tipos celulares. Puede ser activado por un gran número de estímulos fisiológicos y patofisiológicos, como citoquinas, mitógenos, virus, estrés oxidativo y mecánico y agentes químicos<sup>103,207</sup>. Las subunidades que constituyen el NF-κB comparten una región central muy conservada, el dominio de homología Rel (DHR), implicado en la unión al DNA, en la interacción con la molécula inhibitoria IκB y en la dimerización. Este dominio contiene además la señal de localización nuclear (SLN) que facilita la translocación al núcleo. Hasta el momento se han identificado cinco componentes de esta familia: c-Rel, NF-κB1 (p50), NF-κB2 (p52), Rel A (p65) y Rel B. Dos de estos miembros (p50 y p52) se obtienen por proteólisis de unos precursores inactivos citoplasmáticos (p105 y p100, respectivamente)<sup>86,108</sup>.

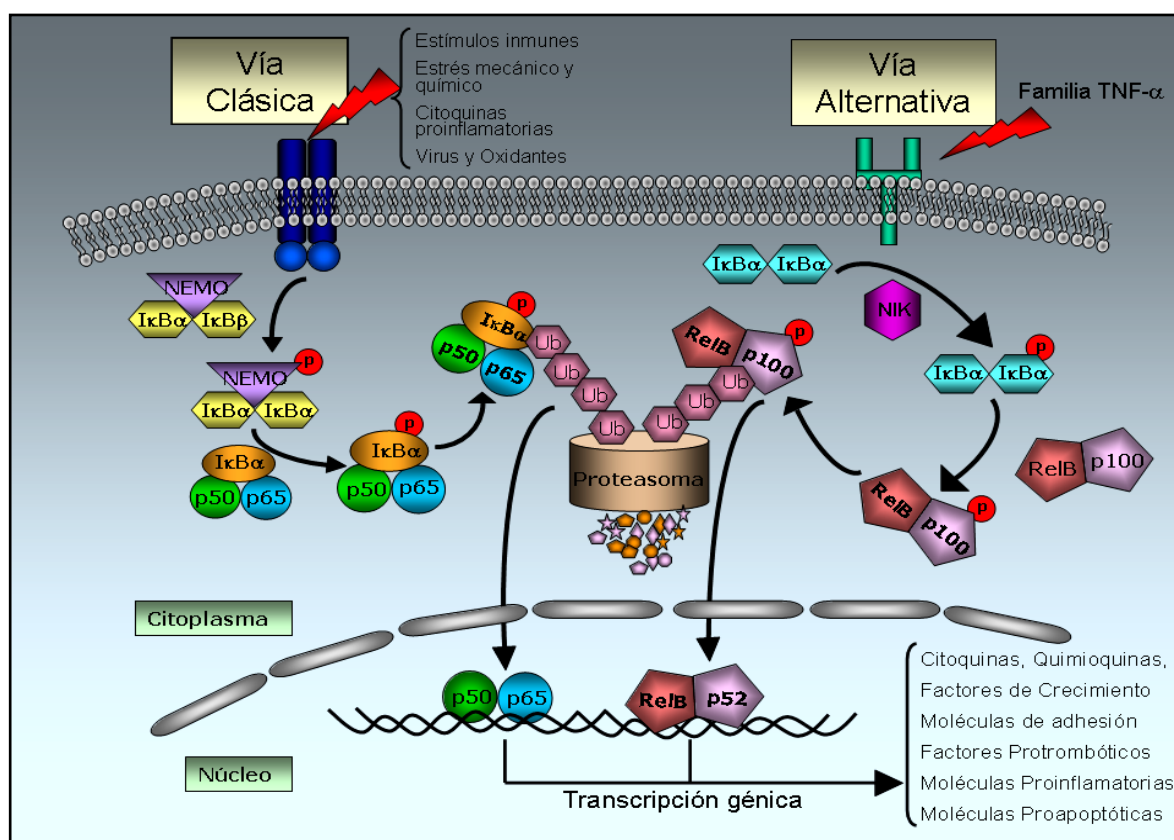


### 3.4.1.- La familia I $\kappa$ B

La familia de proteínas I $\kappa$ B, está constituida por las proteínas I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$ , I $\kappa$ B $\gamma$ , I $\kappa$ B $\epsilon$  y Bcl- $\delta$ . Las más importantes son I $\kappa$ B $\alpha$  (unida al heterodímero p50/p65 y relacionada con la activación transitoria de NF- $\kappa$ B o vía clásica), I $\kappa$ B $\beta$  (implicada en una activación más estable o vía no-clásica) e I $\kappa$ B $\epsilon$ <sup>181</sup> (Figura 4). Ejercen su función inhibitoria bloqueando la región de localización nuclear SLN<sup>207</sup>, liberando los diferentes dímeros que penetran en el núcleo y activan los genes respuesta<sup>51</sup>. La interacción entre las subunidades inhibitorias y los miembros de la familia Rel es específica, de manera que, mientras que I $\kappa$ B $\alpha$  e I $\kappa$ B $\beta$  inhiben los dímeros que contengan p65 y/o c-Rel, I $\kappa$ B $\gamma$  y Bcl-3 se unen preferentemente a los complejos que portan p50 y/o p52<sup>207</sup>.

### 3.4.2.- Activación de NF- $\kappa$ B

NF- $\kappa$ B se encuentra en el citoplasma como una forma inactiva, asociado a las proteínas reguladoras I $\kappa$ B. Puede activarse por diferentes estímulos fisiológicos y no fisiológicos como hemos mencionado anteriormente<sup>103,207</sup>. Se conocen dos vías de activación del NF- $\kappa$ B: **Vía Clásica y Vía Alternativa**<sup>86,135</sup> (Figura 4). Estas vías se diferencian en los miembros de la familia de quinasas IKK que participan en la fosforilación de la subunidad inhibitoria I $\kappa$ B<sup>51,207</sup>. En esta tesis nos centraremos en el estudio de la vía clásica de activación.



**Figura 4.- Mecanismo de activación de la Vía Clásica y de la Vía Alternativa de NF- $\kappa$ B.** NEMO: Proteína quinasa moduladora de NF- $\kappa$ B; NIK: Proteína quinasa inductora de NF- $\kappa$ B. El resto de las proteínas aparecen descritas en el texto.

La **Vía Clásica** es la responsable de la regulación de la inflamación, así como el control de la proliferación y apoptosis de las células linfoides en la respuesta inmunitaria<sup>86,207</sup>. Esta vía es de acción rápida y reversible, debido a la presencia de múltiples mecanismos de retroalimentación negativos. Una vez producida la activación del NF- $\kappa$ B, se produce la fosforilación de I $\kappa$ B $\alpha$ , mediada por el complejo de quinasas IKK<sup>51,86</sup>. La fosforilación de la subunidad I $\kappa$ B $\alpha$  hace que se ubiquitine y posteriormente sea degradada por el proteosoma 26S. El **dímero p50/p65** libre se transloca al núcleo, dónde se une a los sitios- $\kappa$ B de los promotores de los genes diana para activar así su transcripción. Entre estos genes diana se encuentran: citoquinas, quimioquinas, factores de crecimiento, moléculas de adhesión, enzimas, moléculas protrombóticas, etc<sup>51,86,135,181,207</sup> (Figura 4).

La presencia de NF- $\kappa$ B en las lesiones ateroscleróticas fue demostrada inicialmente por Brand et al.<sup>27</sup>. Posteriormente, se ha demostrado la presencia de NF- $\kappa$ B activado en los núcleos de macrófagos, células endoteliales y CMLV de lesiones ateroscleróticas humanas<sup>25,135</sup>. Otros autores han demostrado que está más frecuentemente presente en células procedentes de lesiones coronarias humanas responsable de un SCA que en las extraídas de pacientes estables<sup>203</sup>. Nuestro grupo ha demostrado que las células presentes en los hombros de las lesiones, la zona más vulnerable a la rotura, muestran mayor actividad de este factor<sup>127</sup>, reforzando la hipótesis de la relación entre inflamación e inestabilidad de la placa de ateroma.

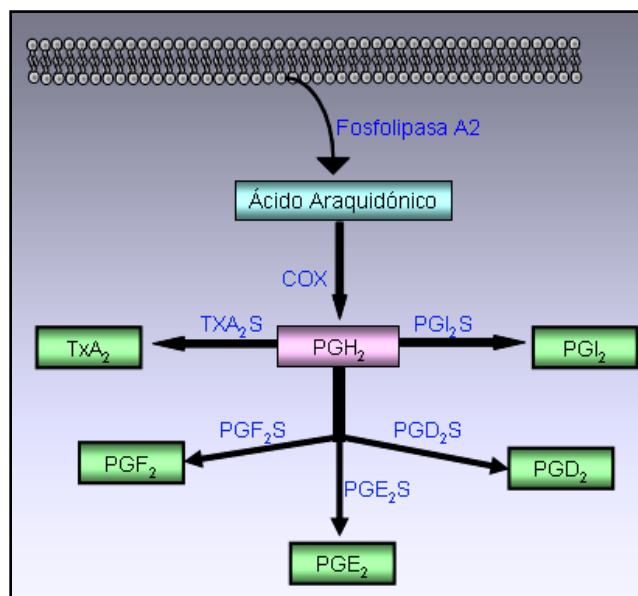
### 3.5. - Metabolismo del Acido Araquidónico

El ácido araquidónico (AA) y sus metabolitos, los eicosanoides, son poderosos moduladores inflamatorios implicados en la patogénesis de la aterosclerosis y trombosis<sup>23,109</sup>. Se sintetiza y/o libera por las células en respuesta a diversos factores como citoquinas proinflamatorias y factores de crecimiento<sup>23,64,109</sup>. La principal vía que conduce a la formación de AA es la hidrólisis de los fosfolípidos de membrana por la enzima fosfolipasa A2 (**PLA2**). Esta enzima es regulada principalmente por niveles de calcio y AMPc y/o por estímulos que inducen fosforilaciones<sup>198</sup>. Las principales rutas de metabolismo del AA incluyen oxigenación, ya sea por ciclooxigenasas, lipoxigenasas, o citocromo P450 monooxigenasas. Estas vías conducen a la formación de los prostanooides, leucotrienos y lipoxinas, ácidos hidroxieicosatetraenoicos y ácidos epoxieicosatrienoicos, respectivamente<sup>64,109,195</sup>. En esta tesis nos vamos a centrar en el estudio de las rutas de la Ciclooxigenasa 2/Prostaglandina E sintasa (**COX-2/PGES**) y 5-Lipoxygenasa/Leucotrieno A4 hidrolasa (**5-LO/LTA4H**) y sus respectivos productos, la prostaglandina E2 (**PGE2**) y el leucotrieno B4 (**LTB4**), respectivamente.

#### 3.5.1. - Ruta de la COX/PGE2

La COX es la enzima que cataliza la conversión de AA a prostanooides. Los prostanooides son mediadores lipídicos implicados en una variedad de procesos fisiológicos y patológicos, incluyendo la homeostasis vascular y renal, la respuesta inmune y la inflamación. La COX cataliza el paso de AA a prostaglandina H2 (PGH2), que rápidamente es transformada en los diferentes eicosanoides<sup>45,109,114</sup> (Figura 5). La COX existe en dos isoformas, COX-1 y COX-2, que son codificadas por dos genes

separados. **COX-1** se expresa constitutivamente en la mayoría de los tejidos y regula funciones como el mantenimiento de la integridad de la mucosa gástrica, la homeostasis, y la función renal. En cambio, la expresión de **COX-2** es inducible y se activa su transcripción en respuesta a citoquinas, mitógenos, etc., siendo NF- $\kappa$ B, uno de los principales factores de transcripción implicados en este proceso<sup>39,114,206</sup>.



**Figura 5.- Biosíntesis de Prostanoides.** Las abreviaturas utilizadas se corresponden con: COX: Ciclooxigenasa; PGH<sub>2</sub>: Prostaglandina H<sub>2</sub>; PGI<sub>2</sub>: Prostaciclina; PGI<sub>2</sub>S: Prostaciclina Sintasa; PGD<sub>2</sub>: Prostaglandina D<sub>2</sub>; PGD<sub>2</sub>S: PGD Sintasa; PGE<sub>2</sub>: Prostaglandina E<sub>2</sub>; PGE<sub>2</sub>S: PGE Sintasa; PGF<sub>2</sub>: Prostaglandina F<sub>2</sub>; PGF<sub>2</sub>S: PGF Sintasa; TxA<sub>2</sub>: Tromboxano A<sub>2</sub>; TxA<sub>2</sub>S: TxA Sintasa.

### 3.5.2.- La Prostaglandina E-2

La PGE<sub>2</sub> es producida en diversos tejidos y tipos celulares. Es sintetizada a partir de PGH<sub>2</sub> por la PGES. Su producción está aumentada durante la respuesta inflamatoria, el dolor, los edemas y la fiebre<sup>21,143,144</sup>. Recientes investigaciones usando genes dianas o inhibidores específicos han confirmado la relevancia de la PGE<sub>2</sub> como mediador de la respuesta inflamatoria<sup>143</sup>, la respuesta inmune<sup>7,187</sup> y además, afecta a la remodelación, formación y reabsorción ósea<sup>43,208</sup>. Además, la PGE<sub>2</sub> está implicada en el proceso aterosclerótico, ya que induce la expresión de metaloproteasas<sup>41,75,76</sup> e inhibe la producción de macromoléculas de la matriz extracelular, tales como fibronectina y colágeno del tipo I y III<sup>102</sup>, favoreciendo que la placa se vaya debilitando y sea más vulnerable y propensa a la rotura. Además, se ha demostrado su implicación en otras enfermedades inflamatorias aparte de la aterosclerosis, enfermedades priónicas, cáncer y artritis reumatoide<sup>57,125,132</sup>.

La PGE<sub>2</sub> ejerce su acción a través de cuatro receptores de membrana acoplados a proteínas G que se denominan EPs (EP1, EP2, EP3 y EP4, siendo los responsables de las diferentes

funciones de la PGE2)<sup>178</sup>. Por tanto un mayor conocimiento de las acciones de PGE2 y a través de qué receptores las realiza, permitiría una posible modulación y regulación de las acciones de esta prostaglandina.

### 3.5.3.- Implicación de la vía COX-2/PGE2 en la patogenia aterosclerótica

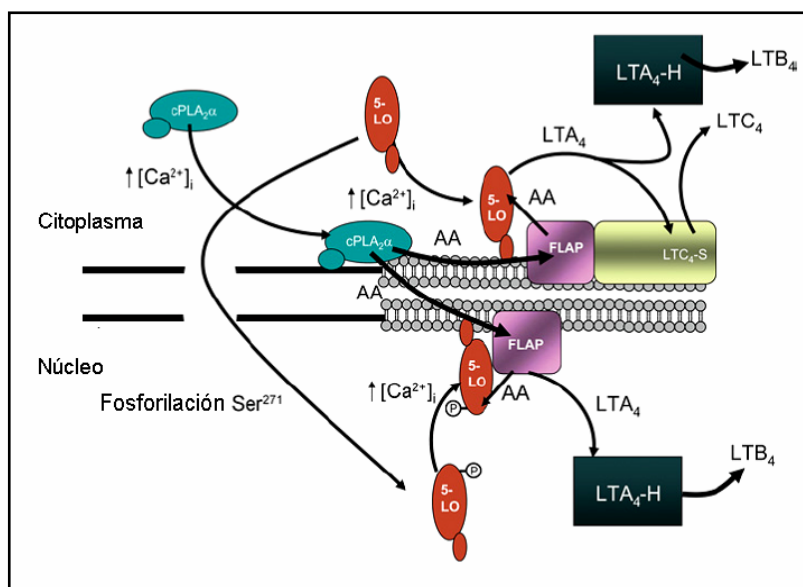
Ambas isoformas de la COX están implicadas en la aterosclerosis, ya sea produciendo prostanoïdes relajantes, vasoconstrictores o inductores plaquetarios. El papel desempeñado por la COX-1 en la activación plaquetaria está firmemente establecido, mientras que el papel desempeñado por la COX-2 genera más controversia.

Se ha demostrado que la COX-1 se expresa constitutivamente en arterias normales, mientras que la COX-2 lo hace en monocitos/macrófagos, células endoteliales y CMLV presentes en las lesiones ateromatosas<sup>75,166,176</sup>. Además que en pacientes con aterosclerosis carotídea, la expresión de COX-2, mPGES y los receptores EPs está incrementada en la región inflamatoria, rica en macrófagos, de las placas ateroscleróticas<sup>41,75</sup>. Por otro lado, se sabe que la producción de MMP-2 y MMP-9 es dependiente de PGE2, y la expresión de estas MMPs se encuentra incrementada en placas carotídeas humanas, provocando la rotura de las fibras de colágeno y el debilitamiento de la cápsula fibrosa que recubre la placa produciéndose su rotura y posterior evento coronario<sup>41</sup>.

### 3.5.4.- Ruta de la 5-LO/LTB4

Los leucotrienos son mediadores lipídicos con potente actividad proinflamatoria. Se sintetizan en la membrana nuclear en respuesta a diferentes estímulos inmunes e inflamatorios. Posteriormente, por medio de transportadores específicos, se secretan al espacio extracelular y allí se unen a receptores acoplados a proteínas G y ejercen así sus diversas funciones<sup>121,195</sup>. La regulación de la síntesis de los leucotrienos ocurre a diferentes niveles, incluyendo la expresión de la 5-LO, translocación de 5-LO a la región perinuclear y fosforilación ya sea para incrementar o inhibir la actividad de la enzima<sup>65,146</sup>.

La producción de leucotrienos se inicia con la activación de la cPLA2 que provoca la liberación del AA de la membrana lipídica (Figura 6). La 5-LO transforma el AA a leucotrieno A4 (LTA4), ayudada por una proteína accesoria denominada proteína activadora de la 5-LO (FLAP), que le sirve a la 5-LO como anclaje a la membrana y le facilita la unión con el AA para su transformación a LTA4. Este LTA4 es muy inestable y rápidamente es metabolizado, bien a LTB4 por acción de la enzima leucotrieno A4 hidrolasa (LAT4H), o a los llamados cisténil leucotrienos (LTC4, LTD4 y LTE4) por acción de la leucotrieno C4 sintasa (LTC4S)<sup>121,146,212</sup>. En esta tesis nos vamos a centrar en el papel de LTB4 y las funciones ejercidas por la unión a sus receptores, BLT1 y BLT2, en la patología aterosclerótica.



**Figura 6.- Organización intracelular y biosíntesis de leucotrienos** (Murphy, R.C.; Gijón, M.A. *Biochem J.* 2007; 405: 379-95<sup>139</sup>).

### 3.5.5.- El Leucotrieno B4 (LTB4)

El LTB4 es un potente mediador lipídico inflamatorio y quimioattractante, sintetizado principalmente por monocitos/macrófagos y células polimorfonucleares<sup>52,146,212</sup>. Está implicado en la síntesis de citoquinas, regulación de linfocitos T y B y citotoxicidad de macrófagos, por lo que juega un importante papel en la regulación inmunológica<sup>121,195</sup>.

Ejerce su acción biológica a través de la unión a 2 receptores de membrana acoplados a proteína-G, el receptor de alta afinidad, BLT1 y el de baja afinidad, BLT2. Además utiliza un sistema de receptor-dual, y se ha demostrado su unión a los receptores nucleares PPAR $\alpha$  que regulan genes diana relevantes para la aterosclerosis, como son los implicados en procesos de  $\beta$ -oxidación. Esto podría causar un feedback negativo resultando en la degradación metabólica del LTB4, limitando así sus acciones proinflamatorias<sup>99,106</sup>.

BLT1 y BLT2 se localizan muy próximos en los genomas humano y murino, formando un cluster y transcribiéndose en la misma dirección, de ahí su homología. BLT1 une específicamente LTB4. En cambio, el BLT2 puede unir otros eicosanoides aparte del LTB4, como son 12(S)-HETE, 12(S)-HPETE y 15(S)-HETE. También difieren en su patrón de expresión, BLT1 se expresa principalmente en leucocitos y BLT2 mucho más ubicuamente encontrándose en diferentes órganos y tejidos (bazo, hígado, ovario y leucocitos). La unión del LTB4 a estos receptores dispara su señalización mediada por diferentes proteínas G ( $G_{\alpha_{i/o}}$ ,  $G_{\alpha_{16}}$ ), induciendo un aumento en la concentración de calcio intracelular y AMPc. El LTB4 incrementa la quimiotaxis y la adhesión de monocitos/macrófagos y neutrófilos hacia el endotelio, aumenta la permeabilidad vascular e induce la síntesis indirecta de moléculas proinflamatorias a través de la señalización inducida por la unión a sus receptores. Por tanto, un mayor conocimiento de la señalización a través de dichos receptores permitiría una posible regulación y modulación de las acciones del LTB4<sup>4,63,85,88</sup>.

### 3.5.6.- Implicación de la ruta 5-LO/LTB<sub>4</sub> en la patología aterosclerótica

Estudios basados en técnicas de inmunohistoquímica y biología molecular, así como hallazgos epidemiológicos, apoyan el papel de la ruta de la 5-LO en la patofisiología de la aterosclerosis. Las lesiones ateroscleróticas expresan toda la cascada de proteínas implicada en la síntesis de los leucotrienos, así como los receptores. Por otro lado, se ha demostrado que los niveles de expresión de la 5-LO se correlacionan con la severidad de las lesiones ateroscleróticas<sup>174</sup> y la inestabilidad de la placa<sup>40,147</sup>. Estudios *in vivo*, utilizando modelos animales, e *in vitro*, han mostrado evidencias de la implicación de los receptores de LTB<sub>4</sub>, principalmente BLT1, en el desarrollo de las lesiones ateroscleróticas<sup>3,14,63,85,123,148</sup>. LTB<sub>4</sub>, a través de la señalización mediada por BLT1, contribuye al reclutamiento de monocitos y a su diferenciación en células espumosas<sup>4</sup>, así como a la hiperplasia intimal<sup>13</sup>.

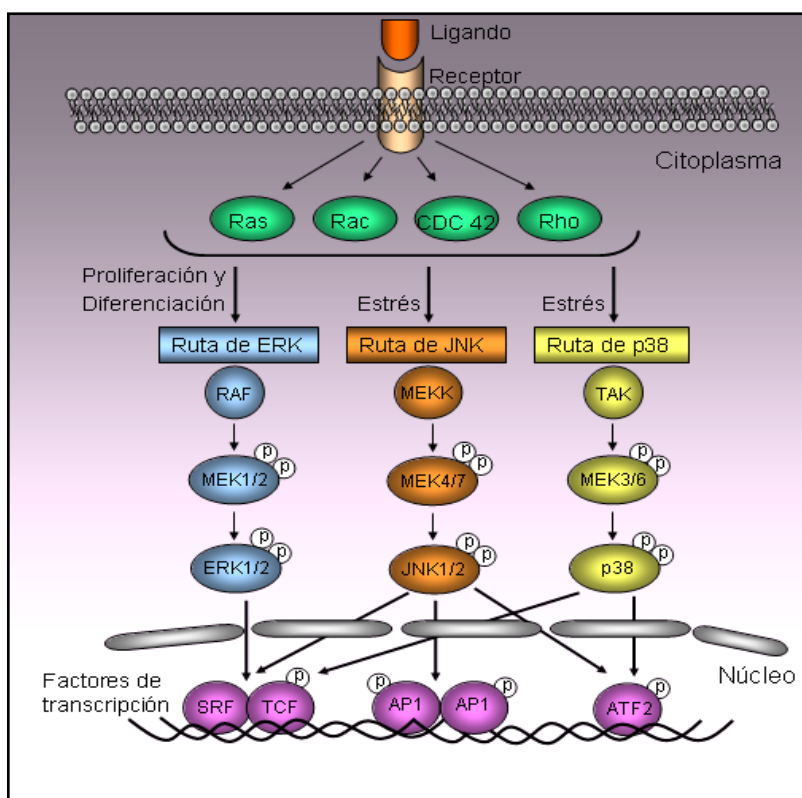
La incidencia de ictus e IAM en poblaciones de negros americanos, europeos y japoneses, se ha relacionado con variantes génicas de FLAP y LTA4H, sugiriendo que éstas provocan superproducción de leucotrienos<sup>83,84,95</sup>. Un estudio piloto realizado en Islandia con individuos que presentaban antecedentes de IAM y tenían una de las variantes génicas que codifican para FLAP y LTA4H, se trataron con un inhibidor de FLAP, el DG031. Los resultados obtenidos fueron una marcada reducción en los niveles de LTB<sub>4</sub>, mieloperoxidasa y proteína C reactiva<sup>79</sup>.

## 4.- SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR

### 4.1.- Cascadas de las proteínas activadas por mitógenos

Las proteínas quinasas activadas por mitógenos (**MAPKs**) son un grupo de proteínas serina/treonina quinasas altamente conservadas a través de las diferentes especies de eucariotas. Las MAPKs tienen un papel muy importante en los procesos celulares, participando en proliferación, respuesta a estrés, apoptosis y defensa inmune, pero también están involucradas en la patogenia de enfermedades como cáncer, arteriosclerosis, diabetes y artritis<sup>53,191</sup>.

Hasta la fecha se han caracterizado cinco grupos distintos de MAPKs en mamíferos: quinasas reguladas por señales extracelulares (ERKs) 1 y 2 (**ERK1/2**), quinasas c-jun amino-terminal (**JNKs**), **p38**, **ERK3/4** y **ERK5**. Aunque cada MAPK tiene unas características únicas, todas las cascadas MAPKs estudiadas hasta ahora comparten una serie de propiedades (**Figura 7**). Cada familia de MAPK está compuesta por un módulo de tres quinasas que se activan fosforilándose de forma secuencial o por interacciones con proteínas G pequeñas de la familia de Ras/RhoA en respuesta a estímulos extracelulares. Las MAPKs también catalizan la fosforilación y activación de un conjunto de quinasas denominadas quinasas activadas por MAPKs (MKs), las cuales representan un paso de amplificación en la cascada catalítica<sup>53,191,197</sup>.



**Figura 7.- Esquema general de la cascada de activación de las MAPKs.**

#### 4.1.1.- Cascada de la MAPK ERK1/2

La cascada de activación de las quinasas ERK1/2, es la más conocida de las cascadas de quinasas activadas por mitógeno. El módulo de quinasas que la componen está formado por las MAPKKKs A-Raf, B-Raf y Raf-1, las MAPKKs MEK1 y MEK2 y las MAPKs ERK1 y ERK2 (Figura 7). Estas últimas presentan una homología del 83% y se expresan en una gran cantidad de tejidos. Esta cascada se activa fuertemente por factores de crecimiento, suero y ésteres de forbol. Los mecanismos de activación suelen ser a través de receptores tirosina-quinasa y de receptores acoplados a proteínas G<sup>53,115,162</sup>.

La señalización de ERK1/2 es un regulador clave de la proliferación celular, y es sabido que mutaciones en estos genes conducen a fenómenos oncogénicos. Por esta razón los inhibidores de esta vía son potenciales agentes anticancerígenos<sup>53,160</sup>.

#### 4.1.2.- Cascada de la MAPK p38

Los diferentes módulos de esta cascada están formados por varias MAPKKK incluidas MEKKs 1-4, MLK2 y 3, CLK, ASK1 y Cot, por las MAPKKs MEK3 y MEK6, y por la MAPK p38 que tiene 4 isoformas ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , y  $\delta$ ) (Figura 7). Las diferentes isoformas de p38 se activan principalmente por estrés físico y químico, citoquinas proinflamatorias, hipoxia y radiación UV<sup>46,162</sup>. Las MAPKs MEK3 y MEK6 tienen gran especificidad por p38, por otro lado, MEK4 es capaz de activar tanto p38 como JNK, por lo que permitiría la unión de ambas vías de señalización<sup>46</sup>.



Numerosos trabajos indican que la activación de p38 es un punto crítico para el mantenimiento de la respuesta inmune e inflamatoria y así p38 está activado en macrófagos, neutrófilos y células T activadas. En este sentido, la inhibición de la activación de p38 regula la expresión de muchas citoquinas, factores de transcripción y receptores de superficie <sup>46,162</sup>.

#### 4.1.3.- Cascada de la MAPK JNK

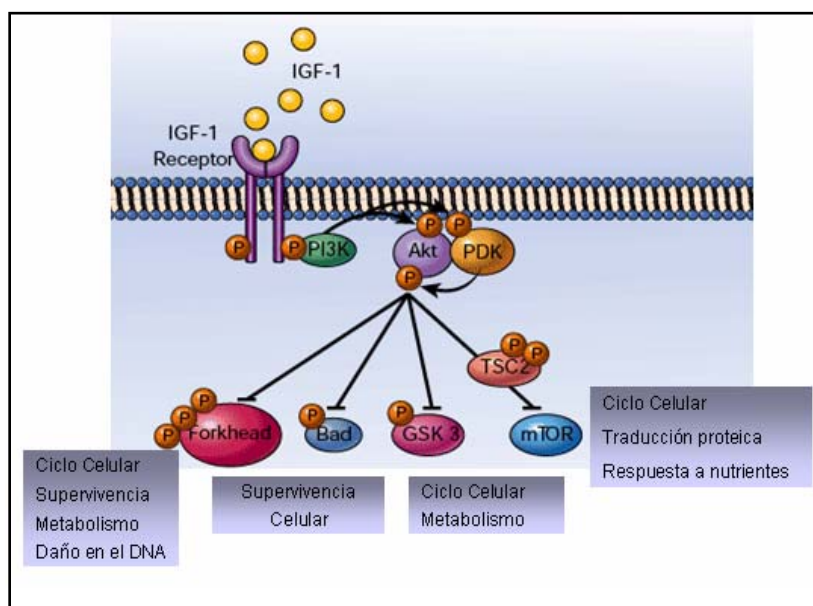
Esta familia de MAPK está compuesta por tres miembros JNK1, JNK2, y JNK3. Las dos primeras JNK1 y JNK2 se expresan ubicuamente, mientras que la expresión de la JNK3 se da principalmente en corazón, cerebro y testículos. Este grupo de MAPKs fue identificado por primera vez como proteínas kinasas que fosforilan el factor de transcripción c- Jun. Otros sustratos conocidos de fosforilación de esta MAPKs son los factores de transcripción ATF-2, NF-AT y STAT3 <sup>191,197</sup>. Esta ruta se activa principalmente en respuesta a citoquinas proinflamatorias, radiación UV, privación de factores de crecimiento, y agentes capaces de dañar el DNA. Los activadores directos de estas quinasas son las MAPKK MKK4 y MKK7 (Figura 7). La MKK4 también fosforila la MAPK p38 en estudios *in vitro*, mientras que MEK7 únicamente activa JNK, por este hecho, no se han desarrollado muchos inhibidores de JNK <sup>53,115</sup>.

#### 4.2.- Cascada de la PI3 quinasa/AKT

**AKT** es una serina/tronina quinasa que pertenece a la familia de las proteínas quinasas B (PKB). Es un regulador de la supervivencia celular, proliferación, tamaño celular, respuesta a disponibilidad de nutrientes, metabolismo de la glucosa, estabilidad del genoma y angiogénesis. Esta familia de quinasas está formada por 3 miembros: AKT1/PKB $\alpha$ , AKT2/PKB $\beta$  y AKT3/PKB $\delta$  <sup>16,54</sup>.

La activación de Akt es un proceso complejo que implica la activación de receptores tirosina quinasa. Akt inactiva permanece desfosforilada en el citosol, las señales extracelulares activan la PI3K en la membrana y ésta cataliza el paso de 4,5-fosfatidil inositol (PIP2) a 3,4,5-PIP3. Este lípido trifosfato tiene gran afinidad por el dominio PH de Akt, haciendo que se transloque a la membrana. Una vez allí, es fosforilada primero por la quinasa dependiente de fosfoinosítidos-1 (**PDK1**) y posteriormente por otra quinasa la **PDK2**, promoviendo esta última fosforilación un cambio conformacional que potencia la actividad de Akt (Figura 8). La actividad de la PI3K es inhibida por la proteína **PTEN**, que es capaz de transformar el PIP3 a PIP2 atenuando la activación de dicha vía <sup>16,54</sup>. Los inhibidores de esta ruta se han utilizado fundamentalmente como herramientas en investigación, teniendo un marcado efecto antitumoral.





**Figura 8.- Representación esquemática de las vías de señalización activadas por PI3K/Akt.**

## 5.- MODULACIÓN FARMACOLÓGICA DE LA RUTA DEL ÁCIDO ARAQUIDÓNICO EN ATEROSCLEROSIS

### 5.1.- Vía COX2/PGE2

Los antiinflamatorios no esteroideos (**AINEs**) son agentes terapéuticos que han demostrado propiedades analgésicas, antiinflamatorias y antitrombóticas, ya que inhiben ambas isoformas de la COX. Estos fármacos presentan una gran toxicidad gástrica asociada debida a la inhibición de COX-1, encargada de la síntesis de prostaglandinas vasodilatadoras. En este grupo se encuentra la aspirina, el ibuprofeno y el naproxeno. Han sido utilizados en el tratamiento de la aterosclerosis debido a su gran capacidad antiinflamatoria y antitrombótica<sup>128,201</sup>. Debido a la toxicidad gástrica que generan, se diseñó una nueva generación de fármacos que inhiben selectivamente la COX-2, los llamados inhibidores selectivos de COX-2 o **COXIBs**.

En este grupo se encuentran el celecoxib y rofecoxib (retirado del mercado), entre otros. No presentan toxicidad gástrica asociada, pero diferentes estudios clínicos han lanzado serias dudas sobre la seguridad cardiovascular de la inhibición de COX-2 por los COXIBs<sup>24,28,173</sup>. El incremento del riesgo cardiovascular producido por este grupo de fármacos se explica por la inhibición selectiva de COX-2, que reduce las cantidades de la PGI<sub>2</sub> vasodilatadora, desplazando el equilibrio de eicosanoides a partir del AA hacia la síntesis del TxA<sub>2</sub>, y promoviendo un estado protrombótico. Todavía en la actualidad existe gran controversia en torno a los inhibidores de COX-2 como una terapia antiinflamatoria segura debido a la evidencia clínica de un aumento del riesgo cardiovascular. Otra de las estrategias utilizadas para disminuir el estado inflamatorio inducido por el incremento en la expresión de la vía COX-2, son las **estatinas** (inhibidores de la 3-hidroxi-3-metil-glutaril coenzima A reductasa), tema al que hemos dedicado un apartado más adelante.

## 5.2- Vía 5-LO/LTB<sub>4</sub>

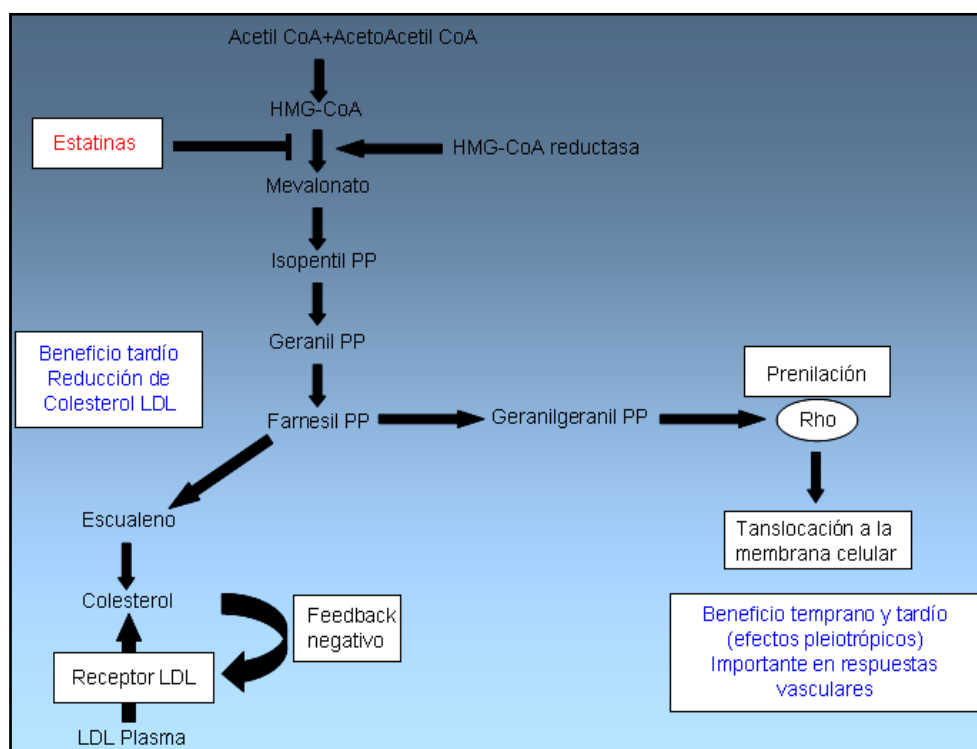
La vía de los leucotrienos se ha implicado desde hace muchos años en patologías principalmente respiratorias, como el asma, alergias, rinitis, etc. Se han desarrollado fármacos que son antagonistas del receptor CysLT<sub>1</sub>, montelukast, zafirlukast y pranlukast, principalmente utilizados en asma. El único fármaco que inhibe la 5-LO y que está aprobado por la FDA, es el zileuton, pero su ingesta lleva asociada toxicidad hepática. Para el tratamiento de las patologías vasculares, no existe ningún fármaco específico en el mercado. Se ha llevado a cabo un ensayo clínico con un inhibidor de la enzima FLAP, el DG031. Este fármaco ha mostrado muy buenos resultados y está siendo reformulado para su uso en fase 3 de ensayos clínicos en prevención de infartos de miocardio<sup>79</sup>. Por otro lado, antagonistas selectivos del receptor BLT<sub>1</sub> han sido diseñados y en la actualidad muchos se están testando en modelos animales de aterosclerosis, aunque todavía no se han aprobado para su uso clínico.

## 5.3.-Estatinas

Las estatinas son potentes inhibidores competitivos de la 3-hidroxi-3-metil-glutaril coenzima A reductasa (HMG-CoA reductasa), enzima clave en la ruta de biosíntesis del colesterol. Cataboliza la deacetilación de HMG-CoA a CoA y mevalonato (Figura 9). Esta ruta es un mecanismo celular crucial para regular el balance dinámico entre los niveles extracelulares e intracelulares de colesterol. El colesterol es obtenido a través de dos vías:

1. **Vía exógena** o absorción de colesterol pre-existente en los alimentos.
2. **Vía endógena** o síntesis de novo, es la síntesis de colesterol en las células animales a partir de su precursor, el acetato, en su forma activada acetil-coenzima A.

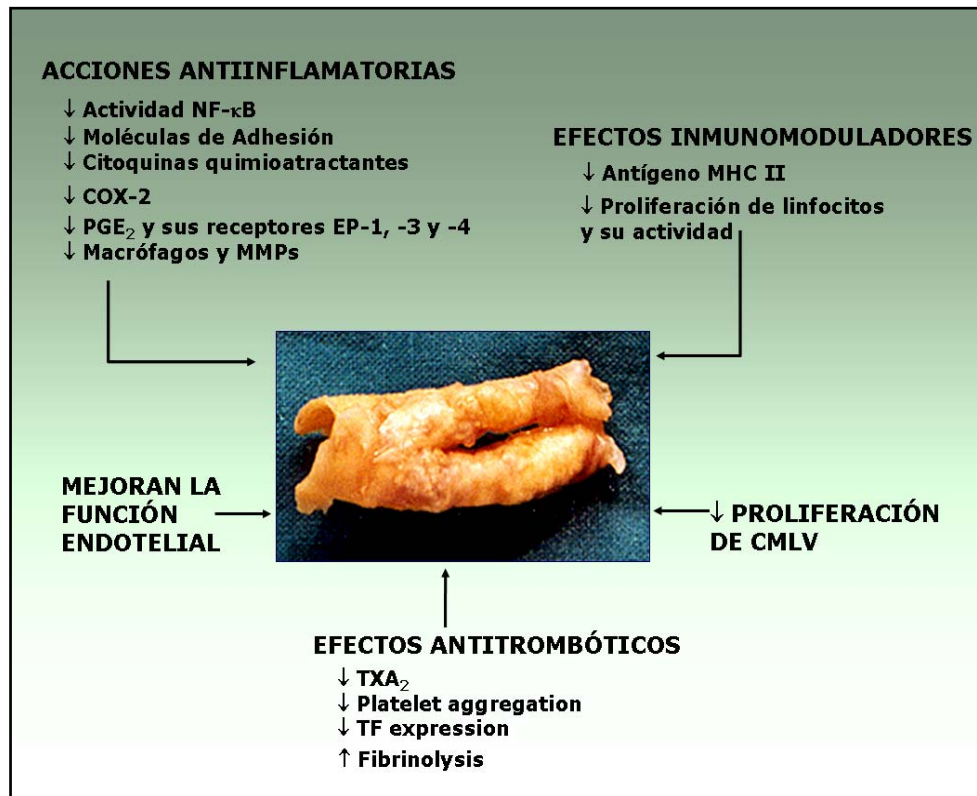
El balance entre estas dos vías independientes de síntesis de colesterol es regulado por un fino mecanismo de feed-back entre la actividad de la enzima HMG-CoA reductasa y la expresión de receptores LDL en la superficie de los hepatocitos (Figura 9). Así, las estatinas disminuyen los niveles plasmáticos de colesterol, no sólo mediante la inhibición de su síntesis, sino también mediante el aumento en su captación por los receptores hepáticos<sup>73,107</sup>. Existe una gran variedad de estatinas en el mercado, pudiendo clasificarse como lipofílicas (simvastatina, lovastatina, fluvastatina y atorvastatina) e hidrofóbicas (pravastatina). De las estatinas naturales la más potente es la simvastatina y de las sintéticas la atorvastatina.



**Figura 9. Ruta de síntesis del colesterol y el efecto de las estatinas.**

#### 4.3.1.- Estatinas y aterosclerosis

Las estatinas constituyen una clase potente de fármacos hipolipemiantes utilizados en el tratamiento de la aterosclerosis. El beneficio clínico obtenido parece ser mayor del esperado por la reducción lipídica que provocan, y se ha sugerido que tienen efectos pleiotrópicos independientes de su acción hipolipemiante. En particular, tanto estudios *in vitro* como *in vivo* han demostrado propiedades antiinflamatorias e inmunomoduladoras de las estatinas sobre las células implicadas en la patogenia de la aterosclerosis<sup>20</sup>. Las estatinas tienen capacidad de regular la adhesión de células inflamatorias al endotelio vascular, disminuyendo la expresión de moléculas de adhesión, proteínas quimioattractantes y MMPs. A su vez, también se ha demostrado que son capaces de disminuir la actividad de factores de transcripción proinflamatorios como el caso del NF- $\kappa$ B, enzimas proinflamatorias, y marcadores inflamatorios serológicos<sup>20,107,210</sup> (Figura 10).



**Figura 10.- Efectos de las estatinas en el desarrollo de la aterosclerosis**

Múltiples estudios de prevención primaria y secundaria, adecuadamente diseñados y amplios en cuanto a número de pacientes y tiempo de seguimiento, han demostrado que la terapia hipolipemiente con estatinas disminuye de forma significativa la morbi-mortalidad por causa cardiovascular. Destacamos un grupo de ensayos clínicos sobre el uso de estatinas vs placebo (Tabla 1), que son representativos del avance producido en los últimos años con el uso de las estatinas en el tratamiento de la enfermedad aterosclerótica.

	4S <sup>1</sup>	WOSCOPS <sup>170</sup>	CARE <sup>163</sup>	HPS <sup>2</sup>
<b>n</b>	4444	6595	4159	20536
<b>Población</b>	Angina o IAM previo	Hombres con colesterol elevado sin previo IAM	IAM	Cardiopatía, patología oclusiva arterial o diabetes
<b>Tratamiento</b>	Simv vs Placebo	Prav vs Placebo	Prav vs Placebo	Simv vs Placebo
<b>Duración</b>	5.4 años	4.9 años	2 años	5 años
<b>Objetivo primario</b>	Incidencia de mortalidad y morbilidad	Incidencia de IAM no fatal y muerte	Evento coronario fatal o IAM no fatal	Muerte, IAM no fatal, suceso cardíaco
<b>Resultados</b>	↓37% infartos ↓25% CT ↓35% LDL-C ↓Mortalidad	↓26% LDL-C ↓29% riesgo coronario ↓11% riesgo de ictus	↓31% ictus ↓24% eventos coronarios	↓25% eventos cardiovasculares

**Tabla 1. Diseño y resultado de algunos estudios clínicos con estatinas vs placebo.** IAM: Infarto agudo de miocardio, AI: Angina inestable, Simv: Simvastatina, Prav: Pravastatina, Atorv: Atorvastatina.

Los ensayos presentados en la Tabla 1 demuestran categóricamente que la terapia hipolipemiente con estatinas a dosis bajas o moderadas disminuye entre un 20 y un 30% la incidencia de eventos cardiovasculares. Más recientemente, han surgido nuevos ensayos clínicos que evidencian los mejores resultados obtenidos con el tratamiento intensivo con estatinas frente a una terapia con dosis bajas o moderadas de las mismas. A continuación se muestra un resumen de los principales ensayos clínicos en los que se compara la terapia intensiva frente a la terapia moderada con estatinas (Tabla 2).

	MIRACL <sup>167</sup>	PROVE IT-TIMI 22 <sup>32</sup>	TNT <sup>105</sup>	IDEAL <sup>145</sup>
<b>n</b>	3086	4162	10001	8888
<b>Población</b>	AI o IAM con onda no Q	Post-SCA	Enfermedad coronaria estable	Enfermedad coronaria estable
<b>Tratamiento</b>	Atorv 80 vs Placebo	40 mg Prav vs 80 mg Atorv	10 mg Atorv vs 80 mg Atorvv	20 mg Simv vs 80 mg Atorv
<b>Duración</b>	16 semanas	24 meses	4.9 años	4.8 años
<b>Objetivo primario</b>	Muerte, IAM no fatal, suceso cardíaco con resucitación, isquemia cardíaca que requiera hospitalización	Muerte, IAM, AI con hospitalización, revascularización (>30 días) e ictus	Muerte cardiovascular, IAM, ictus, resucitación después de suceso cardíaco	Muerte cardiovascular, IAM, resucitación después de un suceso cardíaco
<b>Resultados</b>	↓ 16% aparición nuevos eventos cardiovasculares ↓ de 124 a 72 mg/dl de LDL -C	↓ LDLc ↓ Incidencia de muerte, IAM, AI con hospitalización, revascularización e ictus ↓ PCR	↓ LDL-C ↓ Incidencia de eventos cardíacos y cerebrovascular	↓ LDL-C ↓ IAM

**Tabla 2. Diseño y resultado de algunos estudios clínicos dónde se utilizó tratamiento intensivo con atorvastatina 80mg/día.** SCA: Síndrome coronario agudo, IAM: Infarto agudo de miocardio, AI: Angina inestable, Simv: Simvastatina, Prav: Pravastatina, Atorv: Atorvastatina.

# Objetivos

## **OBJETIVO GENERAL:**

El objetivo general de esta Tesis es profundizar en el estudio de los sistemas COX-2/PGE2 y 5-LO/LTB4 y su implicación en la aterotrombosis, a nivel agudo, en pacientes con SCASEST, y a nivel crónico, en pacientes con aterosclerosis carotídea.

## **Objetivos concretos:**

1. Analizar a nivel sistémico la expresión de la vía COX-2/PGE2, la activación del factor nuclear NF- $\kappa$ B y la actividad de la MMP-9, a lo largo de 6 meses en pacientes con SCASEST, en comparación con pacientes con enfermedad coronaria estable y sujetos sanos. Estos estudios se realizarán a nivel de plasma y PBMCs.
2. Estudiar el efecto del tratamiento precoz e intensivo con altas dosis de atorvastatina sobre los parámetros inflamatorios estudiados anteriormente en los pacientes con SCASEST, comparándolos con un tratamiento convencional a nivel de plasma y PBMCs.
3. Investigar la expresión del sistema 5-LO/LTA4H, su producto LTB4 y los receptores BLT1 y BLT2, a nivel de las placas ateroscleróticas, PBMCs y plasma en pacientes con aterosclerosis carotídea.
4. Analizar el papel del eje LTB4/BLT1/BLT2 y su implicación en los procesos inflamatorios asociados a la enfermedad aterosclerótica en monocitos en cultivo, profundizando en la implicación del factor nuclear NF- $\kappa$ B y genes dependientes del mismo.



# **Materiales y Métodos**

## 1- ESTUDIOS IN VIVO

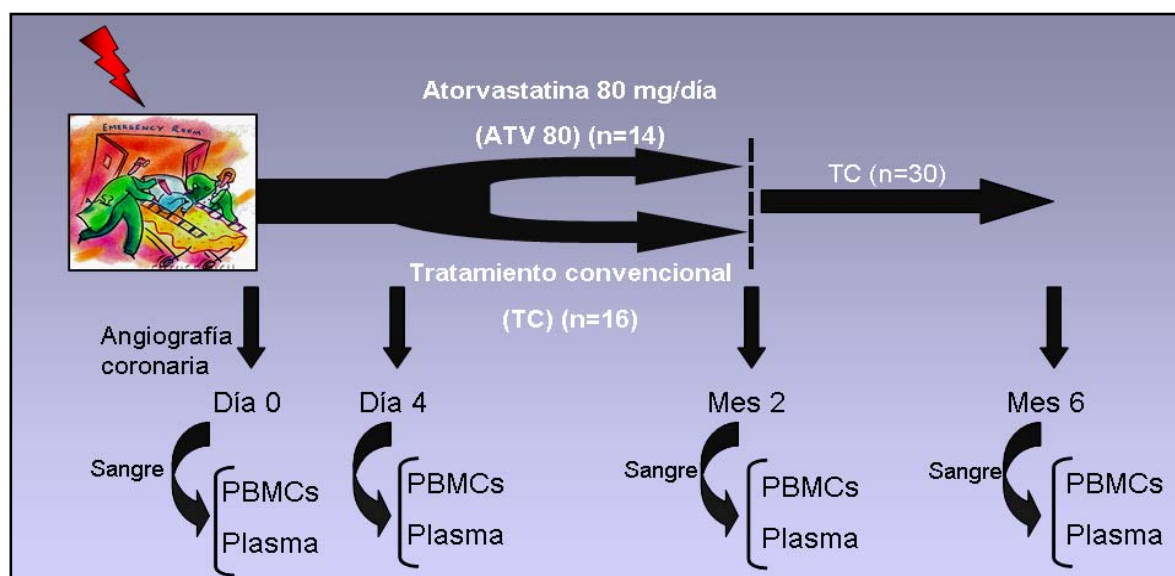
### 1.1.- Diseño del estudio en pacientes con SCASEST

El estudio se realizó con pacientes que ingresaron en el Hospital Fundación de Alcorcón (Madrid) y que habían sufrido un síndrome coronario agudo sin elevación del segmento ST (SCASEST). Treinta pacientes entre 40–80 años de edad con este diagnóstico fueron admitidos en el estudio previa aceptación y firma del consentimiento informado (Figura 11).

Los criterios de inclusión en el estudio fueron:

- Pacientes con angina de reposo de más de 20 min. en las 24h previas al ingreso ó angina de grado III-IV, bien de reciente comienzo ó progresión de angina previa.
- Electrocardiograma con descenso del segmento ST transitorio ( $>0.05$  mV) ó inversión de la onda T ( $>0.02$ mV) de nueva aparición que fueran considerados diagnóstico y/o
- Elevación de la Troponina I

Este estudio fue revisado y aprobado por el comité ético del Hospital Fundación de Alcorcón (Madrid). En el momento del diagnóstico (**Día 0**), se les extrajeron muestras de sangre para el estudio. Las extracciones de sangre se volvieron a repetir a los cuatro días (**Día 4**), dos meses (**Mes 2**) y seis meses (**Mes 6**). Después de la segunda extracción (**Día 4**), los pacientes fueron aleatorizados en dos grupos, uno de ellos recibiría tratamiento con altas dosis de atorvastatina 80mg/día (**ATV80**) (n=14) y el otro grupo recibiría un tratamiento convencional (**TC**) (n=16), que podía incluir, si el especialista lo consideraba necesario, otra estatina.



**Figura 11.- Diseño del estudio en pacientes con SCASEST.**

Los criterios de exclusión utilizados en el estudio fueron:

- Enfermedad inflamatoria, tumoral ó alteraciones de la coagulación
- Tratamientos crónicos, salvo el de cardiopatía isquémica y sus factores de riesgo
- Fracción de eyección <45%, ya que se ha visto que la disfunción ventricular se asocia a una exacerbación de la inflamación<sup>184</sup>, y esto podría interferir en los resultados
- Cirugía ó trauma mayor en el mes previo
- Otra cardiopatía salvo la hipertrofia ventricular secundaria a hipertensión arterial
- Participación en otro ensayo clínico en los 30 días anteriores a la visita de selección.
- Circunstancias contraindicadas para el tratamiento con estatinas ó no adecuadas para el diseño del estudio:
  - ✓ Colesterol total >260 mg/dl y LDL<100 mg/d, en ausencia de estatinas
  - ✓ Hipersensibilidad conocida a cualquier inhibidor de la HMG-CoA reductasa
  - ✓ Enfermedad hepática activa o disfunción hepática con las transaminasas AST o ALT  $\geq 1,5$  veces el límite superior de la normalidad, determinadas en cualquier momento previo a la asignación aleatoria
  - ✓ Mujeres en periodo de lactancia o de gestación.
  - ✓ Hipercolesterolemia secundaria a patologías asociadas.
  - ✓ Niveles de creatina fosfoquinasa CPK >3 veces el límite superior de la normalidad
  - ✓ Otras anomalías importantes que el investigador pensara que podían poner en peligro la seguridad del paciente o su participación con éxito en el estudio.

Para completar el estudio, se incluyeron otros dos grupos de sujetos para posteriores comparaciones. Por un lado, pacientes con enfermedad coronaria estable y por otro, un grupo control de individuos sanos.

El grupo de pacientes con enfermedad coronaria estable (estables), incluía 10 pacientes con edad y sexo similares a los sujetos con SCASEST. Los criterios de inclusión fueron:

- Pacientes con enfermedad coronaria demostrada por coronariografía o infarto previo (de más de un año de antigüedad) y que estuvieran asintomáticos o con angina de grado I-II. El infarto previo se definía como:
- Ondas Q patológicas en el electrocardiograma y alteraciones de la contractilidad concordantes en el ecocardiograma o en la perfusión basal por isótopos ó
- Historia de un episodio de angina y/o malestar general agudo acompañados de alteraciones isquémicas en el electrocardiograma y alguno de los siguientes:
  - ✓ Elevación de la creatina fosfoquinasa CPK-MB 2 veces el límite alto del valor normal en una ocasión tras el cuadro con posterior caída.

- ✓ Cualquier elevación de CPK-MB comprobada en 2 ocasiones con posterior caída.
- ✓ Aumento de troponina T/I en al menos una ocasión en las 24h siguientes al evento.

Los criterios de exclusión en el grupo de pacientes estables fueron:

- Evento cardiovascular o revascularización en el año previo.
- Resto de criterios fueron similares a los utilizados en pacientes con SCASET.

El grupo de controles sanos comprendía 16 individuos con edades y sexo similares a los pacientes con SCASET y coronarios estables, sin evidencia clínica de enfermedad cardiovascular o de otro tipo. Tanto a los sujetos con enfermedad coronaria estable, como a los controles se les realizaron extracciones de sangre para poder realizar comparaciones con respecto al grupo de pacientes con SCASEST.

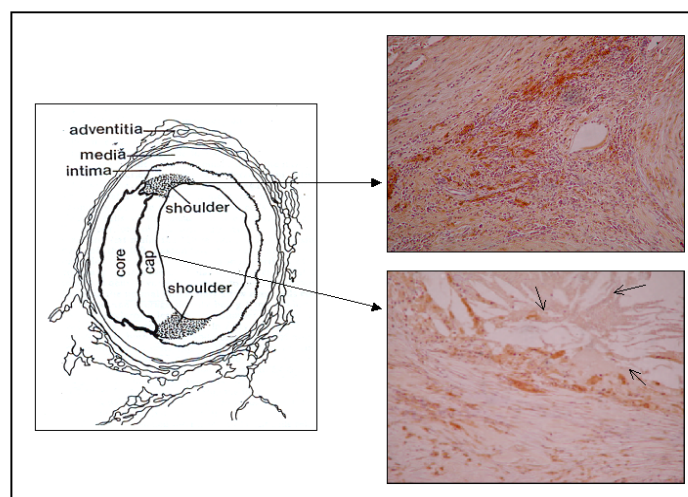
En las muestras de sangre recogidas de los tres grupos de seguimiento se aisló el plasma, para medir las concentraciones circulantes de PGE2 y LTB4 mediante ELISA, y estudiar la actividad gelatinolítica de la MMP-9 mediante zimografía. También se realizó el aislamiento de las Células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) para realizar estudios de actividad de unión al DNA del factor nuclear NF- $\kappa$ B mediante ensayos de EMSA.

## **1.2- Diseño del estudio en pacientes con aterosclerosis carotídea**

En este estudio se seleccionaron pacientes de ambos sexos sin límite de edad que eran sometidos a endarterectomía carotídea en la Fundación Jiménez Díaz (Madrid), previo consentimiento informado en todos los casos. El estudio fue aprobado por el Comité Ético de la Fundación Jiménez Díaz y de acuerdo con las guías institucionales. Se incluyeron 17 pacientes y el día de la intervención quirúrgica se les recogió las muestras de las placas carotídeas extraídas mediante endarterectomía y 30 mL de sangre. Todas las carótidas presentaban diferentes grados de calcificación y se procedió a su descalcificación en ácido etilendiamino tetraacético (EDTA). Para el análisis de las placas se utilizó la zona de la bifurcación de la carótida (el lugar donde se forman las placas ateroscleróticas preferentemente). Los datos analizados se estudiaron en dos zonas diferentes de la lesión: los hombros y la cápsula. La región de los hombros se definió como la zona que se encuentra a ambos lados del núcleo lipídico y la cápsula fibrosa como la zona sobre el ateroma (Figura 12). Los criterios de exclusión en este estudio fueron:

- Enfermedad inflamatoria, tumoral ó alteraciones de la coagulación

- Fracción de eyección <0.45
- Tratamientos crónicos



**Figura 12. Esquema de un corte transversal de la placa de una arteria carótida.** En las placas se puede distinguir la zona de la cápsula (cap, la de los hombros (shoulder) y el núcleo lipídico (core. Asimismo se pueden diferenciar las tres capas de la arteria: adventicia, media e íntima. A la derecha de la figura, se muestra una inmunohistoquímica de la placa aterosclerótica carotídea. En la parte superior, el hombro y en la parte inferior, la cápsula. En esta última fotografía, se puede diferenciar el núcleo lipídico, en el que se visualizan los cristales de colesterol (→).

Se estudió también un grupo de 19 adultos sanos de edad y sexo similar a los pacientes, a los que se les extrajeron muestras de sangre para su posterior comparación con el grupo de pacientes con estenosis carotídea.

En las placas extraídas a los pacientes, se realizaron estudios de inmunohistoquímica, comparándose la zona de los hombros respecto de la zona fibrosa o cápsula. Aparte, de la sangre extraída, tanto a los pacientes como a los controles, se aislaron las PBMCs, para realizar análisis de expresión génica y el plasma para medir los niveles circulantes de LTB4 (ELISA).

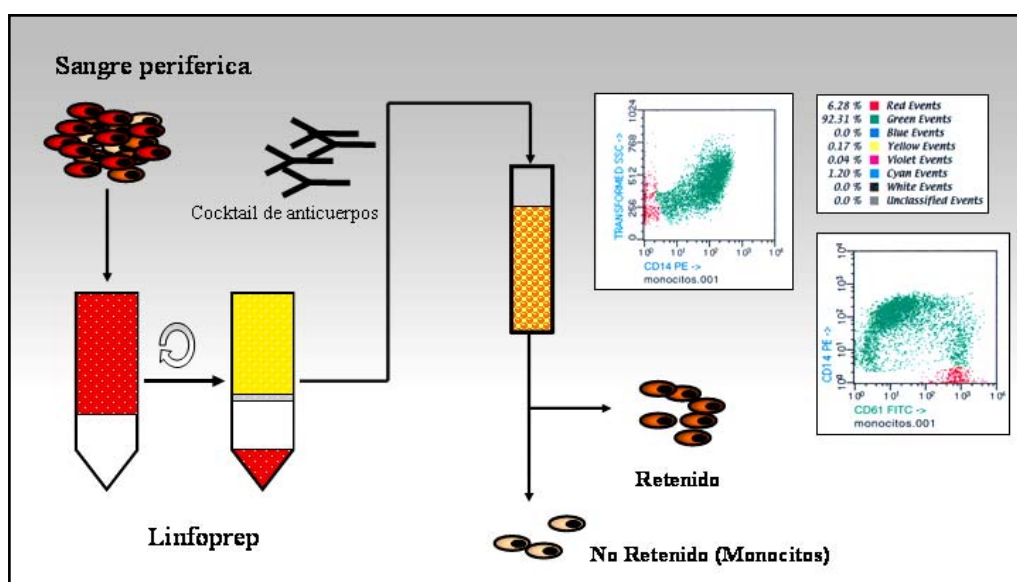
### 1.3.- Procesamiento de las muestras

#### 1.3.1.- Muestras para análisis histológico

Las muestras de endarterectomía extraídas a los pacientes con aterosclerosis carotídea se recogieron y almacenaron en paraformaldehído durante 24 h. Después se pasaron a etanol 70% y se incluyeron en parafina para ser cortadas posteriormente en el microtomo en láminas de 4mm a 5mm y montadas en cristales tratados con poly-L-lisina.

### 1.3.2.- Aislamiento de las PBMCs

Una parte de la sangre extraída a los sujetos incluidos en nuestro trabajo, se utilizó para estudiar el plasma y otra para aislamiento de PBMCs. En este último caso, la sangre se diluyó en tampón salino fosfato (PBS) 1:1 y las células se separaron en 5 mL de un gradiente de ficoll (Solución de aislamiento de linfocitos, Rafer) por centrifugación a 2000g durante 30min. Posteriormente las PBMCs se resuspendieron y se pasaron por una columna con anticuerpos específicos para linfocitos (anti-CD3 DAKO), separándolos así del resto de monocitos (Figura 13). Una parte del eluido se resuspendió en tampón A (10 mmol/L Hepes pH=7.8, 15 mmol/L KCl, 2 mmol/L  $MgCl_2$ , 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L ditiotretitol, 1 mmol/L PMSF) para estudios de proteínas nucleares y otra parte se resuspendió en Trizol (Invitrogen) para estudios de RNA.



**Figura 13. Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica.**

### 1.3.3.- Aislamiento del plasma

A partir de 4 ó 5 ml de la sangre extraída de los sujetos que participaron en los diferentes estudios, se centrifugó a 2500 g, durante 10 min. obteniéndose las muestras de plasma, que se almacenaron a -80°C hasta su utilización.

## 2. ESTUDIOS IN VITRO

### 2.1.- Línea de células monocíticas humanas

La línea celular monocítica U-937 se adquirió en ATCC (1593-CRL) (TIB 202). Los monocitos

se cultivaron en medio RPMI 1640 (BioWhitaker, Verviers, Bélgica) suplementado con 10% de suero bovino fetal (SBF) de complementado con calor, 2mM L-glutamina, 100 U/ml penicilina y 100 mg/ml estreptomicina, a 37 °C en una atmósfera con 5% CO<sub>2</sub>. Para los diferentes experimentos las células se depletaron en medio libre de SBF durante 48h. En el diseño de los experimentos celulares hemos usado distintos tratamientos o fármacos que se muestran en la [Tabla 3](#).

	DOSIS UTILIZADA	FUNCIÓN	CASA COMERCIAL
LTB4	10 <sup>-7</sup> mol/L	Quimioquina proinflamatoria	Cayman
MK-886	10 <sup>-8</sup> mol/L	Inhibidor de FLAP	Cayman
Bestatina	10 <sup>-5</sup> mol/L	Inhibidor de LTA4-H	Cayman
U-75302	10 <sup>-7</sup> mol/L	Inhibidor del Receptor BLT1	Cayman
Ly-255283	10 <sup>-7</sup> mol/L	Inhibidor del Receptor BLT2	Cayman
PD-98059	10 <sup>-5</sup> mol/L	Inhibidor de p42/44 MAPK	Alexis
SB-203580	10 <sup>-6</sup> mol/L	Inhibidor de p38 MAPK	Alexis
SP-600125	10 <sup>-5</sup> mol/L	Inhibidor de JNK MAPK	Stressgen
Wortmanina	10 <sup>-6</sup> mol/L	Inhibidor de PI3K	Calbiochem
Partenolide	10 <sup>-5</sup> mol/L	Inhibidor de NF-κB (Inhibidor de la ruta IKK/NF-κB)	Sigma
Bay-117082	10 <sup>-5</sup> mol/L	Inhibidor de NF-κB (inhibe la fosforilación de IκBα)	Sigma
MG-132	10 <sup>-5</sup> mol/L	Inhibidor de NF-κB (Inhibidor del proteosoma)	Calbiochem
Tiron	5x10 <sup>-5</sup> mol/L	Antioxidante	Sigma
DPI	10 <sup>-5</sup> mol/L	Antioxidante	Sigma

**Tabla 3. Fármacos usados in vitro**

### 3. TÉCNICAS EMPLEADAS

#### 3.1. -Inmunohistoquímica

Las muestras incluidas en parafina y cortadas con el microtomo se desparafinaron y rehidrataron mediante un gradiente de concentraciones decrecientes de etanol. La actividad peroxidasa endógena se inhibió incubando los cortes en 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/metanol (1:1) a 25°C durante 30 minutos. En los casos que fue necesario se realizó una digestión de las secciones con 0.01% de tripsina en CaCl<sub>2</sub> durante 20 min a 37°C para facilitar la unión del anticuerpo al epítipo diana.

Seguidamente se eliminaron las uniones inespecíficas tratando los cortes durante 1 h. a 25°C

con una solución de bloqueo, y se incubaron a 4°C durante toda la noche con el anticuerpo primario (Ver Tabla 4). Después de lavarse con PBS, las secciones se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado con biotina en todos los casos. La detección de las inmunohistoquímicas se realizó durante 30 min a 37 °C con el complejo ABC/Complex (Dako) que está conjugado con peroxidasa, para amplificar la señal. Las muestras se revelaron con 3,3'-diaminobenzidina (Dako) como cromógeno y se contrastaron con hematoxilina de Mayer. Finalmente se deshidrataron y se montaron en Pertex (Meditex). En cada experimento se incluyeron controles negativos sin el anticuerpo primario o usando la correspondiente IgG, para controlar las tinciones no específicas.

Los estudios de colocalización se realizaron en cortes seriados de una misma pieza de las placas ateroscleróticas de los pacientes. Las tinciones realizadas para estudios de colocalización fueron frente a macrófagos, CMLV, 5-LO, FLAP, LTA4-H, BLT1 y BLT2. En este caso también realizamos controles negativos para descartar la existencia de tinción no específica.

Bloqueo	Digestión	Anticuerpo Primario	Anticuerpo Secundario
PBS + 4%BSA + 6% suero de cabra	Tripsina	CD68 (1/100) (Dako) en PBS + 4% BSA	Anti IgG-raton (1/200) (Amersham)
PBS + 4%BSA + 6% suero de cabra	No	HHF-35 (1/100) (Dako) en PBS + 4% BSA	No necesita
PBS + 4%BSA + 6% suero de caballo	Tripsina	5-LO (1/100) (Sta. Cruz) en PBS + 4% BSA	Anti-IgG-ratón (1/200) (Amersham)
PBS + 4%BSA + 12% suero de caballo	Tripsina	FLAP (1/100) (Sta. Cruz) en PBS + 4% BSA	Anti-IgG- conejo (1/200) (Amersham)
PBS + 4%BSA + 6% suero de caballo	Tripsina	LTA4-H (1/100) (Cayman) en PBS + 4% BSA	Anti-IgG- conejo (1/200) (Amersham)
PBS + 4%BSA + 6% suero de caballo	Tripsina	BLT1 (1/100) (Cayman) en PBS + 4% BSA	Anti-IgG- conejo (1/200) (Amersham)
PBS + 4%BSA + 6% suero de caballo	Tripsina	BLT2 (1/50) (Cayman) en PBS + 4% BSA	Anti-IgG- conejo (1/200) (Amersham)

**Tabla 4. Anticuerpos y condiciones utilizadas en inmunohistoquímica.**

### 3.2.-Southwestern in situ

Para localizar en tejidos las células que presentan complejos NF- $\kappa$ B activos usamos la técnica histoquímica llamada Southwestern *in situ*<sup>127</sup>. La distribución y la actividad de unión al DNA



de NF- $\kappa$ B in situ se detectó usando una sonda de doble hebra de DNA marcada con digoxigenina con una secuencia específica para NF- $\kappa$ B<sup>127</sup>.

Después de rehidratar la secciones en concentraciones decrecientes de etanol, fijamos las muestras con 0.5% de paraformaldehído y posteriormente las tratamos con 5mmol/L de levamisol durante 30min. La digestión del tejido, realizada para favorecer la entrada del oligonucleótido, se realizó con 0.5% de pepsina en HCl 1N durante 30min a 37°C. Para romper las hebras de DNA y permitir la unión del oligo marcado, incubamos las muestras con 0.1 mg/mL de DNasa durante 20min. Posteriormente, dejamos las muestras durante toda la noche a 37°C con oligonucleótidos NF- $\kappa$ B marcados con digoxigenina (100 pmol/mL). La detección se realizó a 37°C durante 30min. con un anticuerpo anti-digoxigenina conjugado con fosfatasa alcalina para amplificar la señal. Finalmente revelamos con NBT, que da color azul a la tinción. Esta técnica es bastante selectiva, identifica al NF- $\kappa$ B cuando está activado y localizado en el núcleo. Las preparaciones sin sonda se utilizaron como controles negativos y se usaron sondas mutantes o ensayos de competiciones con un exceso de 200 veces de sonda no marcada para testar la especificidad de la técnica.

Los ensayos de colocalización del factor nuclear activo NF- $\kappa$ B con distintas proteínas se hicieron en la misma preparación simultáneamente. En primer lugar, realizábamos la técnica de southwestern *in situ* para localizar dónde se encontraba activo el NF- $\kappa$ B (tinción azul), y posteriormente, mediante una inmunohistoquímica específica para cada una de las proteínas de nuestro estudio (tinción marrón), comprobábamos si se expresaban a la vez el factor nuclear NF- $\kappa$ B activo dentro del núcleo con las proteínas diana presentes en el citoplasma.

### 3.3.- Cuantificación Histológica

La cuantificación de las muestras inmunohistoquímicas se realizó mediante ordenador con un Sistema semiautomático Olympus con un software Micro Imageä (versión 1.0 para windows) por el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico de Madrid. Las preparaciones se digitalizaron con un microscopio Olympus (BH-2), a 400X de magnificación, conectado a una videocámara CCD. Todas las medidas se hicieron con colores reales. Las imágenes obtenidas se preprocesaron con un instrumento de segmentación de color, que permite la separación de objetos positivos para ser posteriormente cuantificados. De este modo, en las arterias carótideas de los pacientes, se seleccionaron al azar dos áreas positivas (96,000 mm cada una) de las regiones de la cápsula y los hombros de cada preparación y así se midieron. Los resultados se expresan como porcentaje de tinción positiva por mm<sup>2</sup>.

### 3.4.- ELISA

Las muestras de plasma extraídas se utilizaron para medir los niveles plasmáticos de PGE<sub>2</sub> y de LTB<sub>4</sub> mediante diferentes kits de ELISA comerciales (R&D System). La técnica del ELISA es una técnica cuantitativa de inmunoensayo por unión competitiva de la molécula de estudio presente en los fluidos que se vayan a analizar (en nuestro caso del plasma) y de la misma molécula añadida

exógenamente y marcada con fosfatasa alcalina, que se unirá a un anticuerpo monoclonal específico y éste a su vez a otro anticuerpo secundario que recubre los pocillos de la placa. Después de varios lavados con un tampón específico, se añade el sustrato, produciéndose una reacción colorimétrica que determina la actividad de unión enzimática. Se mide la absorción espectrofotométrica a una determinada longitud de onda especificada en cada kit, siendo la intensidad del color inversamente proporcional a la concentración de la molécula del estudio en cada muestra.

Todas las determinaciones de nuestros estudios se realizaron por duplicado. Utilizamos 100 µl de muestra, midiéndose en paralelo a concentraciones estándar conocidas. Cada ensayo lo calibramos utilizando una curva estándar con concentraciones conocidas de los metabolitos estudiados, PGE<sub>2</sub> y LTB<sub>4</sub>. El valor mínimo detectado para PGE<sub>2</sub> fue de 27pg/mL. Los coeficientes de variación intra- e inter-ensayo fueron de 8%-12% y 7%-10%, respectivamente. Para el caso del LTB<sub>4</sub>, el valor mínimo detectado fue de 46 pg/mL y los coeficientes de variación intra- e inter-ensayo fueron de 5%-7% y 5%-12%, respectivamente.

### **3.5.- Ensayos de retardo de movilidad electroforética EMSA**

#### **3.5.1.- Extracción de proteínas nucleares**

Las células en estado de reposo fueron incubadas con diversas drogas durante diferentes tiempos y después lavadas con salino frío y resuspendidas en tampón-A (10 mmol/L Hepes pH=7.8, 15 mmol/L KCl, 2 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L ditioneitol, 1 mmol/L PMSF). En el caso de las PBMCs, después de su último lavado, parte de ellas se resuspendieron en tampón-A. Los extractos nucleares y citosólicos se separaron por centrifugación<sup>75</sup>. Brevemente, tras mantener las células en tampón-A durante 10min. y en hielo, se centrifugaron y volvieron a resuspender en tampón-A para homogeneizarlas. Mediante centrifugación a 12.000 rpm durante 10min, se separó la fracción citosólica de la nuclear, almacenándose a -80°C hasta su estudio. El precipitado conteniendo los núcleos volvió a resuspenderse en tampón-A y se le añadió KCl 3 mol/L hasta llegar a una molaridad final de 0.39 mol/L. Con esta solución se incubaron durante 45 minutos a 4°C y se centrifugaron a 12.000 rpm durante 60 min. Los sobrenadantes, con los extractos nucleares, se dializaron toda la noche a 4°C en tampón-C (50 mmol/L Hepes pH=7.8, 50 mmol/L KCl, 10% glicerol, 1 mmol/L PMSF, 1 mmol/L DTT y 0.1mmol/L EDTA). Las muestras recogidas de la diálisis, que contenían los núcleos celulares, se almacenaron a -80°C hasta su análisis. Las proteínas, tanto citosólicas como nucleares, se valoraron a través del método colorimétrico BCA (Pierce Biotechnology).

#### **3.5.2.- Marcaje del oligonucleótido consenso**

El marcaje del oligonucleótido de NF-κB (5'-AGTTGAGGGGACTTTCCCAGGC-3', Promega Corp. Madison, WI) se realizó mediante incubación a 37°C durante 10 min, con 10U de T<sub>4</sub> polinucleótido quinasa (Promega-Madison, WI), en cuya reacción se añadieron 10 mCi de [γ-<sup>32</sup>P]ATP, 70 mmol/L Tris-HCl, 10 mmol/L MgCl<sub>2</sub> y 5 mmol/L DTT. Finalmente la reacción se paró con EDTA

hasta una concentración final de 0.05 mol/L y se llevó hasta un volumen final de 100ml con tampón TE (Tris-HCl- EDTA).

### 3.5.3.- Ensayo de unión

La actividad de unión al DNA de NF- $\kappa$ B la evaluamos por unión de 6-10  $\mu$ g de extracto proteico nuclear, con el oligonucleótido consenso de NF- $\kappa$ B (5'-AGTTGAGGGGACTTTCCCAGGC-3', Promega Corp. Madison) marcado con [ $\gamma$ - $^{32}$ P]-ATP. Para establecer la especificidad de la reacción, incluimos controles negativos sin extractos celulares y además, ensayos de competición con un exceso (100 veces) del oligo NF- $\kappa$ B sin marcar. Los complejos formados proteína-DNA se separaron del exceso de sonda no unida en un gel no desnaturizante de poliacrilamida al 4% en 0.25% TBE (Tris-HCl- Ac. Bórico- EDTA). Los geles se secaron y se expusieron para autorradiografía.

La cuantificación se realizó mediante análisis densitométrico dándose los resultados en unidades arbitrarias densitométricas (UAD). Para comparar diferentes grupos y disminuir diferencias entre experimentos realizados en distintos días (entre-ensayos), en cada experimento incluimos una muestra control (un mismo paciente o un punto sin tratamiento), para tomarlo como referencia.

Para los ensayos de *superretardo* de NF- $\kappa$ B se añadió 1 $\mu$ g de anticuerpo frente a sus subunidades p50 y p65, durante una hora a temperatura ambiente y antes de la incorporación del NF- $\kappa$ B marcado. Posteriormente se añadió el NF- $\kappa$ B marcado y se siguió el protocolo explicado anteriormente.

## 3.6.- Extracción y medida de la calidad-pureza del RNA

Aislamos el RNA por el método del Trizol (Invitrogen) siguiendo el protocolo de extracción de RNA recomendado tanto en las PBMCs como en las células *in vitro*. La cuantificación de la concentración de RNA se determinó por la medida, en un espectrofotómetro, de la absorbancia a 260 y 280 nm. teniendo en cuenta que 1 unidad de absorbancia corresponde a 40 mg/ml de RNA. Su pureza se calculó mediante la proporción de la absorbancia a 260 nm y a 280 nm, considerándose una pureza adecuada de RNA aquella que tuviera un valor de Abs 260/280 = 1.8-2.0; estos valores garantizan que la muestra está prácticamente libre tanto de fenol como de proteínas.

### 3.6.1.- Análisis por PCR a tiempo real

Sometimos 1  $\mu$ g de RNA a una reacción de transcripción reversa usando el kit High Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystem), y de acuerdo a las instrucciones del fabricante incubamos las diferentes muestras durante 15 min a 25°C y 2h a 37°C. La PCR a tiempo real se llevó a cabo en un sistema de detección de secuencia TaqMan ABI 7500 usando una polimerasa activada por calor TaqDNA (Amplitaq Gold). Después de un paso inicial de 2 min mantenidos a 50°C y 10 min a 95°C, las muestras se sometieron a 40 ciclos de 95°C durante 15 seg y 60°C durante 60 seg. Utilizamos la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH) y el 18S ribosómico como genes endógenos que amplificamos en paralelo a los genes de interés. Normalizamos la expresión de cada gen de interés

con la expresión de los genes endógenos. Para todos los análisis cuantitativos del cDNA utilizamos un software informático PRISM 7000 (Applied Biosystems)<sup>119,123</sup>.

Las sondas utilizadas estaban todas diseñadas por Applied Biosystems y se describen en la Tabla 5. Los oligos, sondas y reactivos fueron adquiridos a Applied Biosystems. Todas las medidas se realizaron por duplicado. Usamos H<sub>2</sub>Odd como control negativo en todos los casos.

GEN	SONDAS	ESPECIE
5-LO	Hs00167536_m1	Humano
FLAP	Hs00233463_m1	Humano
LTA4-H	Hs00251637_m1	Humano
BLT1	Hs00175124_m1	Humano
BLT2	Hs001885851_s1	Humano
MCP-1	Hs00234140_m1	Humano
TNF- $\alpha$	Hs00174128_m1	Humano
IL-6	Hs00174131_m1	Humano
GA3PDH	Hs99999905_m1	Humano
18S	4310893E	Euariota

**Tabla 5. Sondas usados para análisis de PCR a tiempo real.**

### 3.7.- Western blot

Para cuantificar los niveles proteicos realizamos análisis de Western blot. Las proteínas procedentes de lisados celulares se valoraron a través del método colorimétrico BCA (Pierce Biotechnology). La misma concentración de proteínas de las distintas muestras fué sometida a separación electroforética mediante geles de poliacrilamida SDS-PAGE, en condiciones reductoras y a diferentes porcentajes en función del peso molecular de las proteínas estudiadas. Posteriormente los geles se transfirieron a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF) (Millipore) y se bloquearon a temperatura ambiente, en TBS con 0,1% Tween 20 (TBST) y leche en polvo desnatada al 7,5% durante 1h. Las membranas se incubaron con el anticuerpo primario (Tabla 6) a una concentración de 1mg/mL durante 18 horas a 4°C. Transcurrido ese período, se lavaron con TBST para eliminar el exceso de anticuerpo y se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente

(Amersham Biosciences), conjugado con peroxidasa, en todos los casos, durante 1 hora a temperatura ambiente. Retiramos el exceso de anticuerpo secundario lavando las membranas en TBST para después detectar las proteínas con el método quimioluminiscente, ECL kit, (Amersham Biosciences).

La calidad de las proteínas y eficacia de la transferencia proteica fue evaluada por tinción con Rojo Ponceau (no mostrado). Las películas se densitometraron y cuantificaron usando el soporte informático ImageQuant (Molecular Dynamics), dándose los resultados en unidades arbitrarias densitométricas (UAD).

ANTICUERPO PRIMARIO	ANTICUERPO SECUNDARIO
p-p38 (1/500) (Sta. Cruz)	Anti IgG-ratón (1/5000) (Amersham)
P38 (1/500) (Sta. Cruz)	Anti IgG-cabra (1/5000) (Amersham)
p-ERK (1/2500) (Sta. Cruz)	Anti IgG-ratón (1/10000) (Amersham)
ERK 1/2 (1/1000) (Sta. Cruz)	Anti IgG-cabra (1/10000) (Amersham)
p-JNK1/2 (1/2000) (Cell Signaling)	Anti IgG-conejo (1/5000) (Amersham)
JNK (1/5000) (Sta. Cruz)	Anti IgG-ratón (1/5000) (Amersham)
p-Akt 1/2/3 (1/1000)(Sta. Cruz)	Anti IgG-conejo (1/5000) (Amersham)
Akt (1/1000) (Sta. Cruz)	Anti IgG-conejo (1/5000) (Amersham)
P-IkB $\alpha$ (1/250) (Sta. Cruz)	Anti IgG-ratón (1/2500) (Amersham)
IkB $\alpha$ (1/500) (Sta. Cruz)	Anti IgG-conejo (1/2500) (Amersham)

**Tabla 6. Anticuerpos utilizadas para Western blot**

### 3.8.- Inmunofluorescencia

Las células procedentes de distintas condiciones experimentales se lavaron con suero fisiológico y se fijaron con 2% de PFA durante 20min. a temperatura ambiente. Posteriormente las permeabilizamos con un detergente, Triton 0.1% durante 5 min a temperatura ambiente, para permitir la entrada de los anticuerpos. Todos los lavados se realizan con una mezcla de PBS/BSA 2% que nos sirve de bloqueo. Incubamos durante toda la noche a 4°C con anticuerpos contra la subunidad p65 (Sta.Cruz) del factor nuclear NF- $\kappa$ B, y luego con anticuerpo secundario marcado con FITC 1h a temperatura ambiente. Después, tratamos las células con una solución de yoduro de propidio y

RNasa con el propósito de diferenciar los núcleos celulares para su visualización con el microscopio confocal. Usamos como control negativo la ausencia de anticuerpo primario (no mostrado). Después de lavar abundantemente, las células se montaron Fluorsave (Calbiochem) y el análisis fluorescente se llevó a cabo en un microscopio confocal Leica DM-IRB (Leica).

### 3.9.- Zimografías

Para analizar la actividad gelatinolítica de la MMP-9 en plasma, utilizamos la técnica de la zimografía. Es una técnica electroforética en geles SDS-PGE con gelatina al 0.1% y en condiciones no reductoras. Se determinó la concentración de proteínas utilizando el método del BCA (Pierce Biotechnology). Se cargaron 10µg de plasma de cada sujeto. Tras la electroforesis, se incubaron los geles en agitación durante 30 min en tampón de renaturalización (Triton X-100 25% (v/v)). Reemplazamos el tampón de renaturalización por el tampón de desarrollo (Tris 50mmol/L, NaCl 0.2mol/L, CaCl<sub>2</sub> 5mmol/L, Igepal 0.02%), y dejamos los geles incubando durante 18h a 37°C. Posteriormente los teñimos con Coomassie Blue R-250 (Merck) durante tiempos variables hasta conseguir una tinción óptima. A continuación, se procede al desteñido de los geles en una solución que contiene metanol, ácido acético y agua destilada, a una proporción de 50:10:40 respectivamente. Las áreas de digestión aparecen como bandas transparentes en el fondo azul del gel que no ha sido degradado por las MMPs. Para comparar diferentes grupos y disminuir diferencias entre ensayos, en cada experimento incluimos una muestra control (un mismo sujeto), para tomarlo como referencia. La cuantificación se realizó mediante análisis densitométrico dándose los resultados en unidades arbitrarias densitométricas (UAD).

## 4.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los análisis estadísticos se realizaron mediante el software SPSS para Windows versión 11.0. Los datos pertenecientes a los estudios realizados en pacientes con SCASEST se expresan como la mediana y los percentiles 25 y 75. Se usó el test de Chi-cuadrado para comparar las características basales cualitativas de los diferentes grupos de pacientes. El test de Kruskal-Wallis seguido del test de Mann-Whitney se utilizó para analizar las diferencias en los datos basales cuantitativos, actividad de NF-κB, niveles plasmáticos de PGE<sub>2</sub> y LTB<sub>4</sub> y actividad gelatinolítica de MMP-9. Para comparar los datos de edad y niveles lipídicos entre los dos grupos de pacientes con SCASEST realizamos el test de Mann-Whitney.

Los datos pertenecientes a los pacientes con aterosclerosis carotídea y a los estudios *in vitro* se presentan como media ± error estándar de la media (EEM), excepto en el caso de los niveles plasmáticos de LTB<sub>4</sub> que se presentan como mediana y los percentiles 25 y 75. Los datos se analizaron mediante test paramétricos (ANOVA y t-student), y cuando fue necesario se utilizó el test de Mann-Witney o Kruskal-Wallis. Los experimentos *in vitro* se repitieron al menos 4 veces. La significación estadística se definió como un valor de  $p < 0.05$ .

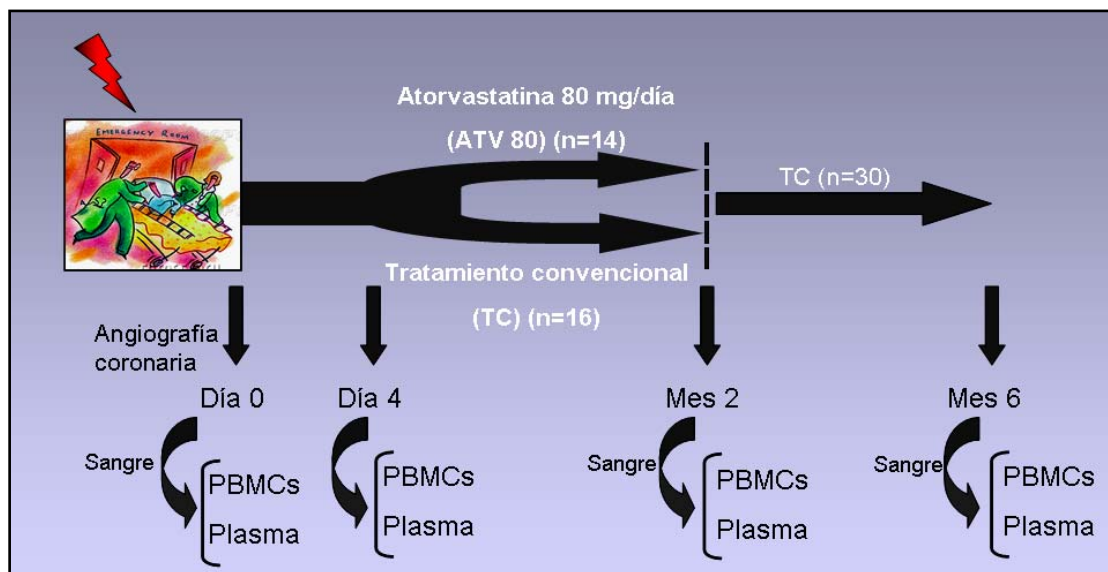
# Resultados

**Parte I: Mediadores  
Inflamatorios y Modulación  
Terapéutica en Pacientes con  
SCASEST**



El SCASEST se debe a una complicación trombótica de una placa aterosclerótica. Esta oclusión suele resolverse mediante una angioplastia con implante de stent ó mediante revascularización quirúrgica. Sin embargo, los individuos pueden tener en su organismo múltiples placas. A pesar de que muchas de ellas no causan obstrucciones severas al flujo sanguíneo cuando son visualizadas en las coronografías, requieren ser tratadas con medidas farmacológicas y cambios en los hábitos de vida para evitar su progresión. En este sentido, se demostró en la década de los ochenta que más de la mitad de los SCA se deben a complicaciones trombóticas de placas que en una coronografía previa solo ocasionaban estenosis a lo sumo moderada<sup>9</sup>.

Las estatinas son uno de los grupos farmacológicos más usados en el tratamiento de la aterosclerosis. Poseen múltiples efectos beneficiosos que modulan la disfunción endotelial, la inflamación y la cascada de coagulación, por lo que su utilización en pacientes que han sufrido SCA tiene efectos muy positivos. En los últimos años se ha observado que el tratamiento intensivo con estatinas es más beneficioso clínicamente que el moderado. Con esta premisa se diseñó un estudio en pacientes que habían sufrido un SCASEST (Figura 14), para estudiar nuevos mecanismos del tratamiento intensivo con estatinas en esta patología.



**Figura 14. Diseño del estudio en pacientes con SCASEST**

## 1.- Características clínicas de los pacientes con SCASEST.

En este estudio participaron treinta pacientes que ingresaron en el Hospital Fundación de Alcorcón (Madrid) con un SCASEST. El diagnóstico final de todos ellos fue que el 13% padecían angina inestable y el restante 87% sufrían IAM con onda no-Q. Su fracción de eyección fue normal

en todos los casos. Del total de los pacientes que participaron en el estudio, al 37% se le realizó una intervención coronaria percutánea, a otro 10% se les realizó un puenteo de la arteria coronaria y el restante 53% sólo recibió tratamiento farmacológico. Además, el 16% de los pacientes recibieron terapia antidiabética. En el grupo randomizado a ATV80 había un mayor número de individuos con antecedentes de SCA, pese a esto no encontramos diferencias significativas entre ambos grupos de tratamiento. En el grupo de controles sanos había un 6% de fumadores y no estaba presente ningún otro factor de riesgo coronario, ni presentaban enfermedad alguna ni usaban tratamiento crónico de ningún tipo (Tabla 7).

	SCASEST (n=30)		p	Estables (n=10)
	ATV 80 (n=14)	TC (n=16)		
Edad	59.0 (52.5-67.0)	61.0 (57.3-69.5)	0.226	55.4 (44.7-61.7)
Sexo (♂-♀)	71%-29%	75%-25%	0.825	75%-25%
Fumadores	29%	63%	0.063	25%
Hipertensos	57%	44%	0.464	67%
Diabéticos	29%	31%	0.873	33%
Patología coronaria previa	29%	6%	0.102	100%
Estatinas	21%	31%	0.544	83%
Antritrombóticos	29%	19%	0.233	92%

**Tabla 7. Características clínicas basales de los pacientes con SCASEST y estable.** Los datos están expresados como porcentaje (%) excepto el dato de la edad que se expresa como mediana (rango intercuartil). La terapia con estatinas y antitrombóticos se refiere a los tratamientos que tomaban los pacientes antes de sufrir el evento. El dato del % de los pacientes fumadores se refiere tanto a los que han fumado en el pasado y/o sigan fumando en la actualidad. La columna con los valores de p se refiere a la significación estadística entre el grupo de pacientes randomizado a ATV80 frente a TC. SCASEST: Síndrome coronario agudo sin elevación del segmento ST; ATV80: Atorvastatina 80 mg/día; TC: tratamiento convencional indicado por el especialista.

Dentro del grupo de 16 pacientes randomizados a TC, 9 recibieron atorvastatina 10 mg/día, 1 atorvastatina 20 mg/día, 2 con simvastatina 10 mg/día, 2 simvastatina 20 mg/día y los 2 restantes no recibieron estatinas. Las terapias coadyuvantes eran similares en ambos grupos, aunque en el grupo TC había mayor número de pacientes que tomaban nitroglicerina (Tabla 8).

	ATV 80 (n=14)	TC (n=16)	P
Antitrombóticos			
-AAS y/o Clopidogrel	93%	100%	0.259
-Anticoagulantes+Clopidogrel	7%	0%	0.259
Antidiabéticos			
-Orales	21%	6%	0.191
-Insulina	7%	0%	0.259
Inhibidores de la ECA	43%	44%	0.897
Betabloqueantes	79%	75%	0.525
Nitroglicerina	14%	50%	0.051
Verapamil/Diltiazem	14%	13%	0.823
Dihidropiridonas	0%	13%	0.186

**Tabla 8. Tratamientos coadyuvantes en ambos grupos de pacientes con SCASEST.** Los datos se expresan como porcentajes. AAS:Ácido acetil-salicílico; ATV80: Atorvastatina 80 mg/día; ECA: Enzima convertidora de Angiotensina II; TC: tratamiento convencional.

## 2.- Perfil lipídico de los pacientes incluidos en nuestro estudio

La hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia son unos de los principales factores de riesgo de aterosclerosis. Las estatinas son inhibidores de la HMG-CoA reductasa, enzima clave en la ruta de síntesis del colesterol, por lo que aparte de su gran capacidad hipolipemiente poseen acciones antiinflamatorias e inmunomoduladoras, entre otras, que reciben el nombre de “efectos pleiotrópicos”.

En las muestras de sangre recogidas de los pacientes con SCASEST, analizamos los niveles lipídicos que presentaban, en el momento del ingreso en el centro hospitalario (Tabla 9). El tratamiento intensivo durante 2 meses con atorvastatina 80mg/día consiguió disminuir los niveles de colesterol total [127 (117-189) vs 171 (152-184) mg/dL;  $p=0.032$ ] y de LDL-colesterol [68 (54-118) vs 110 (78-119) mg/dL;  $p=0.025$ ] en relación al tratamiento convencional. Los niveles de HDL-colesterol y triglicéridos también estaban disminuidos en el grupo ATV80 respecto al grupo con tratamiento convencional, pero no llegaron a obtener significación estadística [37 (34-46) vs 43 (33-51) y 87 (64-196) vs 99 (77-149) mg/dL, respectivamente] (Tabla 9). Estos resultados nos muestran que el tratamiento precoz e intensivo con atorvastatina consiguió una mayor disminución en los niveles de colesterol total y de LDLc respecto al tratamiento convencional.

	Pacientes con SCASEST				Pacientes estables (n= 10)
	ATV 80 (n=14)		TC (n=16)		
	Día 0	Mes 2	Día 0	Mes 2	
Colesterol total (mg/dL)	204 (179-230)	127 (117-189) *	195 (187-213)	171 (152-184)	130 (132-262)
LDL-C (mg/dL)	132 (108-157)	68 (54-118) *	131 (120-143.8)	110 (78-119)	103 (65-168)
HDL-C (mg/dL)	36 (31-43)	37 (34-46)	38 (34-47)	43 (33-51)	33 (35-68)
Triglicéridos (mg/dL)	156 (95-220)	87 (64-196)	151 (97-164)	99 (77-149)	197 (81-278)

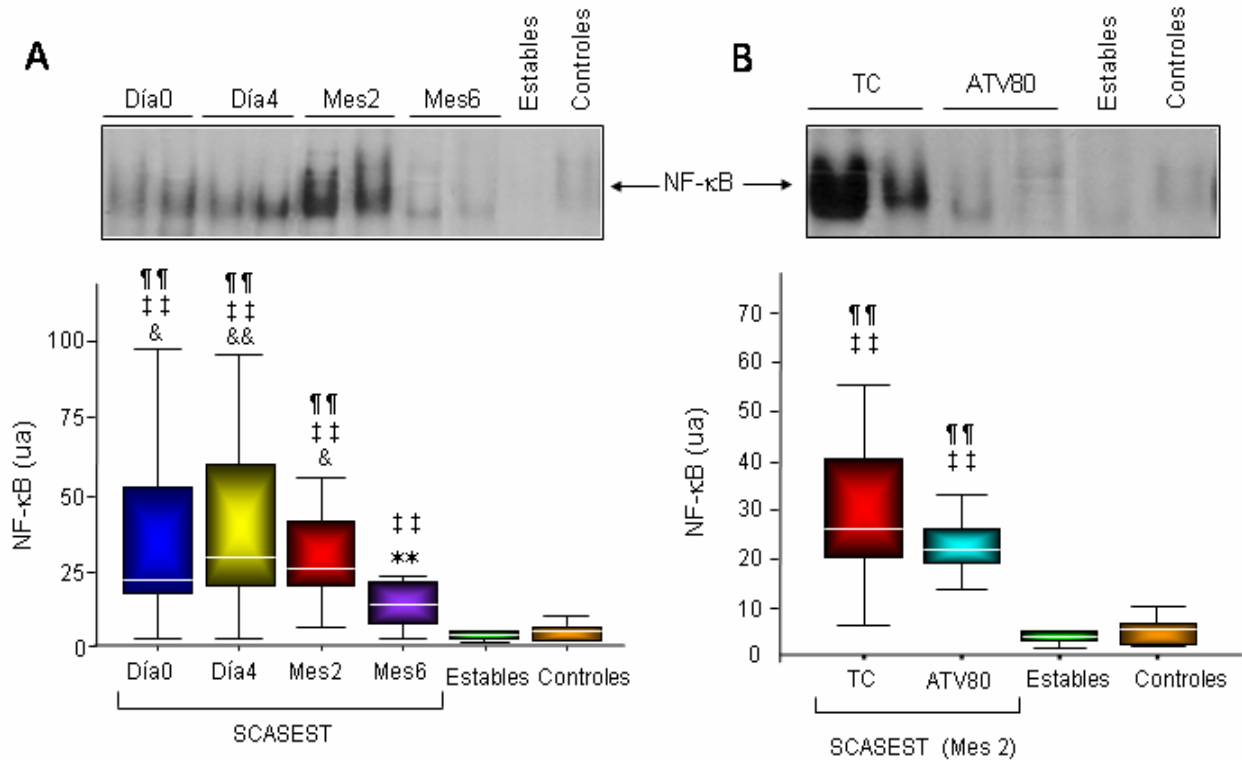
**Tabla 9. Perfil lipídico de los pacientes con SCASEST y los pacientes estables.** Los datos están expresados como mediana (rango intercuartil) \*  $p < 0.05$  vs TC Mes 2. SCASEST: Síndrome coronario agudo sin elevación del segmento ST; ATV80: Atorvastatina 80 mg/día; TC: tratamiento convencional.

### 3.- El tratamiento intensivo con atorvastatina disminuye la activación del factor nuclear NF- $\kappa$ B en pacientes con SCASEST

La inflamación y la trombosis juegan un papel crítico en la vulnerabilidad e inestabilización de la placa aterósclerótica. Muchos de los genes implicados en esa respuesta inflamatoria aguda y fundamental para el desarrollo de la aterosclerosis, son activados por el factor nuclear NF- $\kappa$ B. La inflamación no solamente se limita a las lesiones ateroscleróticas, sino que también puede estar presente a nivel sistémico<sup>42, 117, 18, 94</sup>. La determinación de la concentración de diversas moléculas inflamatorias en sangre circulante puede predecir el desarrollo de síndromes coronarios agudos<sup>42,94,116,117,158</sup>.

Con estas premisas, nuestro siguiente objetivo fue analizar la activación del factor nuclear NF- $\kappa$ B en los monocitos circulantes aislados de las muestras de sangre de los diferentes grupos de estudio. Mediante EMSA observamos que el grupo de pacientes con SCASEST presentaban en el momento de la admisión [21.0 (16.4-53.5) u.a.], a los 4 días [28.5 (19.3-59.5) u.a.] y a los dos meses [25.2 (19.9-43.5) u.a.], una activación significativamente incrementada del factor nuclear NF- $\kappa$ B en relación a los controles [5.2 (2.1-6.5) u.a.] y a los sujetos con enfermedad coronaria estable [3.9 (2.5-4.6) u.a.;  $p < 0.001$  para todas las comparaciones] (Figura 15A). En el momento de finalización del estudio (Mes 6), los sujetos con SCASEST presentaban una reducción en la activación del NF- $\kappa$ B [13.2 (7.0-18.5) u.a.,  $p < 0.005$  vs día 0 y  $p < 0.001$  vs Día 4], pero los valores de NF- $\kappa$ B estaban todavía incrementados respecto al grupo control ( $p < 0.005$ ) y al grupo de pacientes con enfermedad

coronaria estable ( $p < 0.001$ ). Cuando analizamos los resultados obtenidos comparando el grupo ATV80 con el TC después de los dos meses de tratamiento (Mes 2), observamos que el tratamiento con atorvastatina 80mg/día disminuyó la activación del NF- $\kappa$ B respecto al grupo con TC, aunque esta reducción no llegó a ser significativa [21.1 (18.5-27.2) u.a. vs 25.2 (19.9-43.5) u.a.  $p = n.s$ ] (Figura 15B).



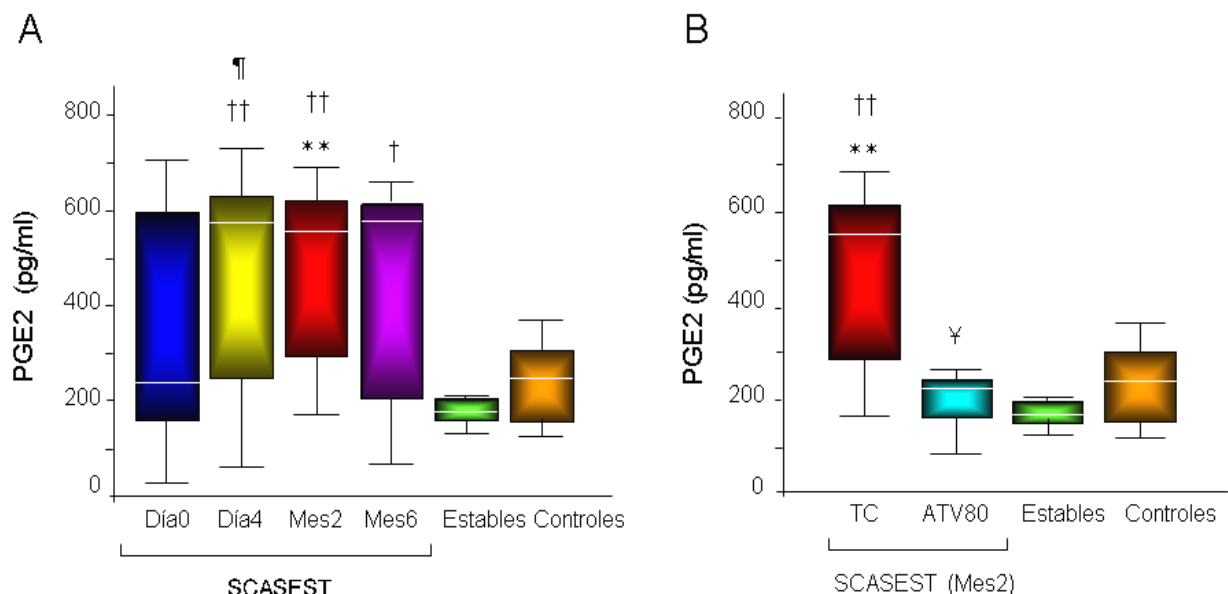
**Figura 15. Actividad de NF- $\kappa$ B en las PBMC de pacientes con SCASEST, estables y sujetos sanos.** (A) Mediante EMSA analizamos la actividad de unión del NF- $\kappa$ B en las PBMCs de pacientes coronarios estables, controles sanos y pacientes con SCASEST a diferentes tiempos. Los datos correspondientes a Mes 2 y Mes 6 pertenecen a los pacientes randomizados al grupo TC. (B) Efecto de la atorvastatina a altas dosis (ATV80) durante 2 meses en la actividad de NF- $\kappa$ B en las PBMCs de pacientes con SCASEST. Los resultados están expresados como unidades arbitrarias (u.a.). ¶¶¶  $p < 0.001$  vs Controles; \*\*  $p < 0.005$  vs Controles; †† $p < 0.001$  vs estables; &  $p < 0.005$  vs Mes6; &&  $p < 0.001$  vs Mes6.

#### 4.-El tratamiento con altas dosis de atorvastatina disminuye los niveles plasmáticos de PGE2 en pacientes con SCASEST

Una de las moléculas proinflamatorias, cuya transcripción está regulada por el factor nuclear NF- $\kappa$ B es la COX-2. En el proceso inflamatorio, la expresión de la COX-2, así como la de la PGES, se encuentra incrementada, dando lugar a una sobreproducción de su producto final, la PGE2. Este metabolito se asocia con la ruptura de la placa aterósclerótica y la posterior producción de síndromes coronarios agudos<sup>75 41</sup>.

El paso siguiente en nuestro estudio fue analizar los niveles circulantes de este metabolito proinflamatorio en el plasma de los pacientes y controles sanos. Para la medida de los niveles plasmáticos de PGE2 utilizamos un kit comercial de ELISA. En el momento del ingreso, los pacientes con SCASEST presentaban unos niveles circulantes de PGE2 más incrementados que los pacientes estables y los controles sanos aunque ese incremento no llego a ser significativo [231.6 (144.8-587.6) vs 181.1 (146.2-228.3) y 240.0 (148.2-306.0) pg/ml, respectivamente] (Figura 16A). Sin embargo, en las medidas realizadas a los 4 días [566.7 (227.6-618.6) pg/ml] y a los dos meses [550.8 (276.9-613.0) pg/ml], estos valores se vieron incrementados significativamente en los pacientes con SCASEST respecto a los controles sanos ( $p=0.009$  y  $p=0.003$  respectivamente) y a los pacientes estables ( $p=0.001$  para ambas comparaciones). Los niveles de PGE2 circulantes seguían aumentados a los 6 meses en el grupo de pacientes con SCASEST que tomaban el tratamiento convencional en relación a los que presentaban los controles sanos ( $p=ns$ ) y los sujetos estables [568.0 (200.0-612.2) pg/ml;  $p=0.020$ ].

El tratamiento con altas dosis de estatinas durante 2 meses redujo los niveles plasmáticos de PGE2 en el grupo tratado intensamente con atorvastatina en relación al grupo con tratamiento convencional [222.4 (157.4-253.5) vs 550.8 (276.9-613.0) pg/ml;  $p=0.006$ ]. Los niveles circulantes de PGE2 que presentaban con pacientes del grupo ATV alcanzaron valores que estaban en el rango de los encontrados tanto en grupo control ( $p=0.650$ ) como en el grupo de pacientes estables ( $p=0.376$ ) (Figura 16B). Estos resultados nos indican que el tratamiento intensivo con atorvastatina es capaz de normalizar los niveles circulantes del metabolito proinflamatorio PGE2 en pacientes con SCASEST.

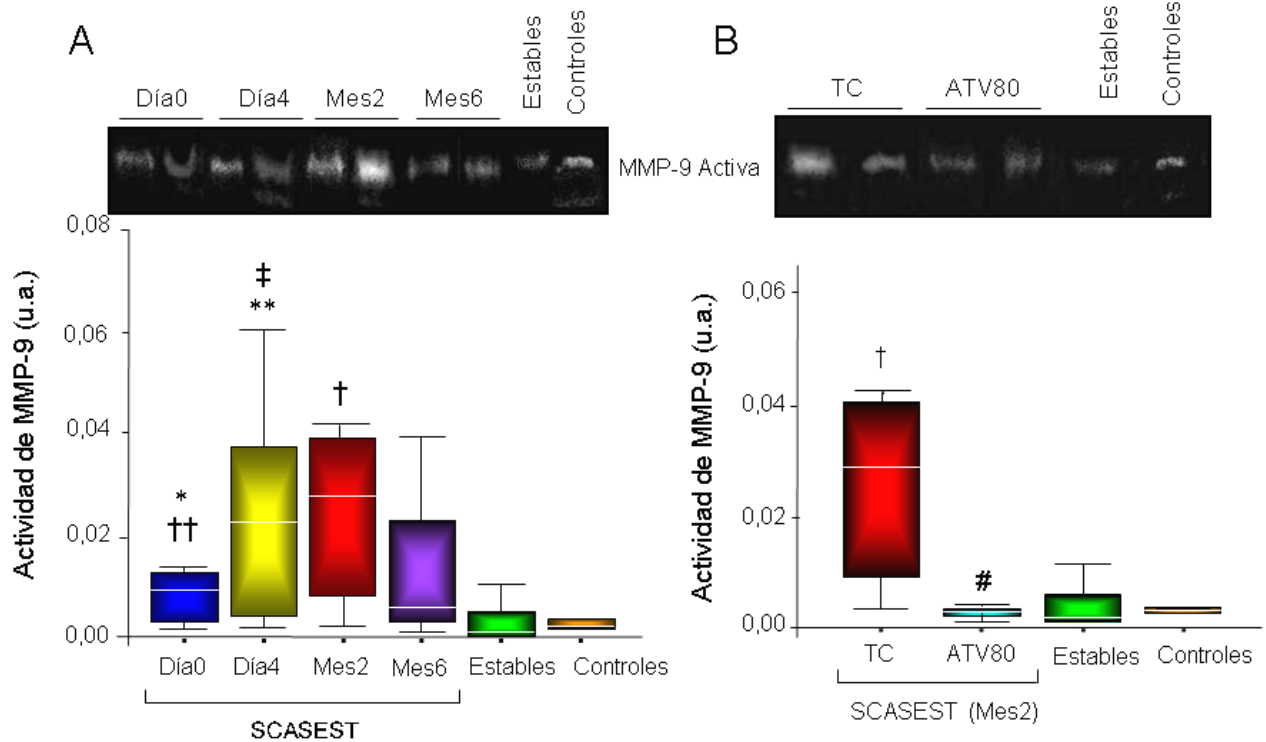


**Figura 16. Niveles plasmáticos de PGE2 en pacientes con SCASEST, coronarios estables y controles sanos. (A)** Los niveles circulantes de PGE2 se midieron mediante la técnica de ELISA en el plasma de pacientes SCASEST, coronarios estables y controles. Los valores presentados en el Mes 2 y Mes 6 se corresponden a los pacientes randomizados al grupo TC. **(B)** Efecto del tratamiento con altas dosis de atorvastatina (ATV80) en los niveles plasmáticos de PGE2 en sujetos con SCASEST. La concentración plasmática de PGE2 se ha medido mediante ELISA y se expresa como pg/ml. \*\* $p<0.005$ vs controles; †  $p<0.01$  vs controles; ††  $p<0.005$  vs estables; ‡  $p<0.05$ vs estables; ‡  $p<0.01$  vs TC

## 5.- La atorvastatina inhibe la actividad proteolítica de la MMP-9 en pacientes con SCASEST

Las MMPs juegan un papel muy importante en la inestabilidad de la placa aterósclerótica debido a su capacidad de degradación de la matriz extracelular<sup>41,75</sup>. Diferentes autores han descrito el aumento en la expresión y en la actividad de la MMP-9 en la zona vulnerable de las placas ateroscleróticas, así como en placas de pacientes con angina inestable<sup>29,69,120</sup>. Por otro lado, se sabe que la expresión y actividad de la MMP-9 es dependiente de COX-2 y de su producto PGE2. En este sentido, al encontrar elevados niveles de PGE2 en el grupo de pacientes con SCASEST, quisimos cuantificar la actividad gelatinolítica de la MMP-9 en el plasma de estos pacientes respecto a los sujetos estables y a los controles sanos. Medimos la actividad de la MMP-9 mediante zimografía en las muestras de plasma de los individuos incluidos en nuestro estudio.

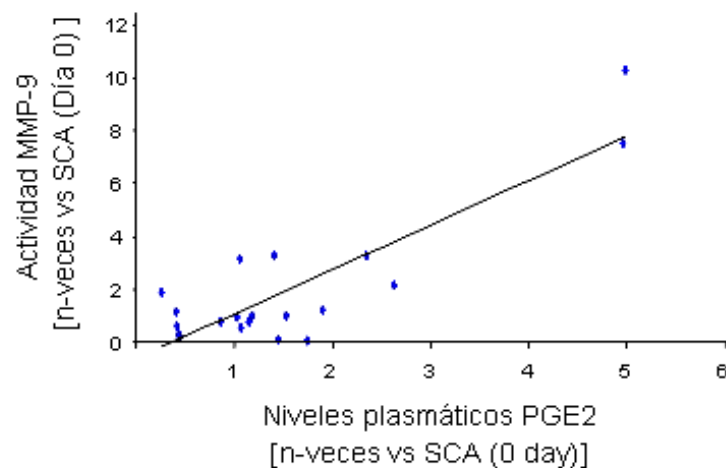
El grupo de pacientes con SCASEST tenía incrementada la actividad gelatinolítica de la MMP-9 ya en el inicio del estudio [0.0100 (0.0033- 0.0140) u.a.] y a los 4 días [0.0228 (0.0040- 0.0377)] respecto a los controles [0.0028 (0.0015-0.0060) y a los pacientes estables [0.0019 (0.0009- 0.0067) u.a.; p=0.013 y p=0.007 respectivamente] (Figura 17A). A los dos meses de comienzo del estudio la actividad de la MMP-9 seguía incrementada respecto a los pacientes con enfermedad coronaria estable [0.0280 (0.0057-0.0712) u.a.; p=0.030)]. A los 6 meses, la actividad gelatinolítica de la MMP-9 había disminuido hasta llegar a valores similares a los que presentaban los pacientes estables y los controles sanos.



**Figura 17. Análisis de la actividad plasmática de la MMP-9 en pacientes con SCASEST, pacientes estables y controles sanos. (A)** La actividad gelatinolítica de la MMP-9 se analizó mediante zimografía en el plasma de pacientes con SCASEST, coronarios estables y controles a diferentes tiempos. Los datos de Mes2 y Mes6 corresponden a los pacientes randomizados a TC. **(B)** Efecto del tratamiento con alta dosis de atorvastatina (ATV80) en la actividad plasmática de la MMP-9 en pacientes con SCASEST. Los geles representativos muestran la forma activa de la MMP-9 (82kD). La actividad plasmática de la MMP-9 se expresa como u.a. \* $p < 0.05$  vs controles; \*\* $p < 0.005$  vs controles; † $p < 0.01$  vs estables ‡ $p < 0.005$  vs estables; † $p < 0.05$  vs estables y # $p < 0.05$  vs TC.

La expresión y la actividad de la MMP-9 en monocitos y macrófagos es dependiente de los niveles de PGE2 presentes en el medio<sup>36,75</sup>. En este sentido, quisimos averiguar si existía correlación entre ambos metabolitos en el plasma de nuestros sujetos de estudio, encontrando una correlación significativa entre la actividad de la MMP-9 y los niveles plasmáticos de PGE2 ( $r=0,754$ ;  $p<0.001$ ) (Figura 18).





**Figura 18.-Correlación entre la actividad de la MMP-9 y los niveles circulantes de PGE2 en el plasma de pacientes con SCASEST.** Los niveles plasmáticos de PGE2 son directamente proporcionales a la actividad de la MMP-9. Cada valor de PGE2 y de MMP-9 está referido al obtenido el día del ingreso, por lo que los resultados se expresan como n veces vs Día 0, considerando el valor a Día 0=1. ( $r=0,754$ ;  $p<0.001$ ).

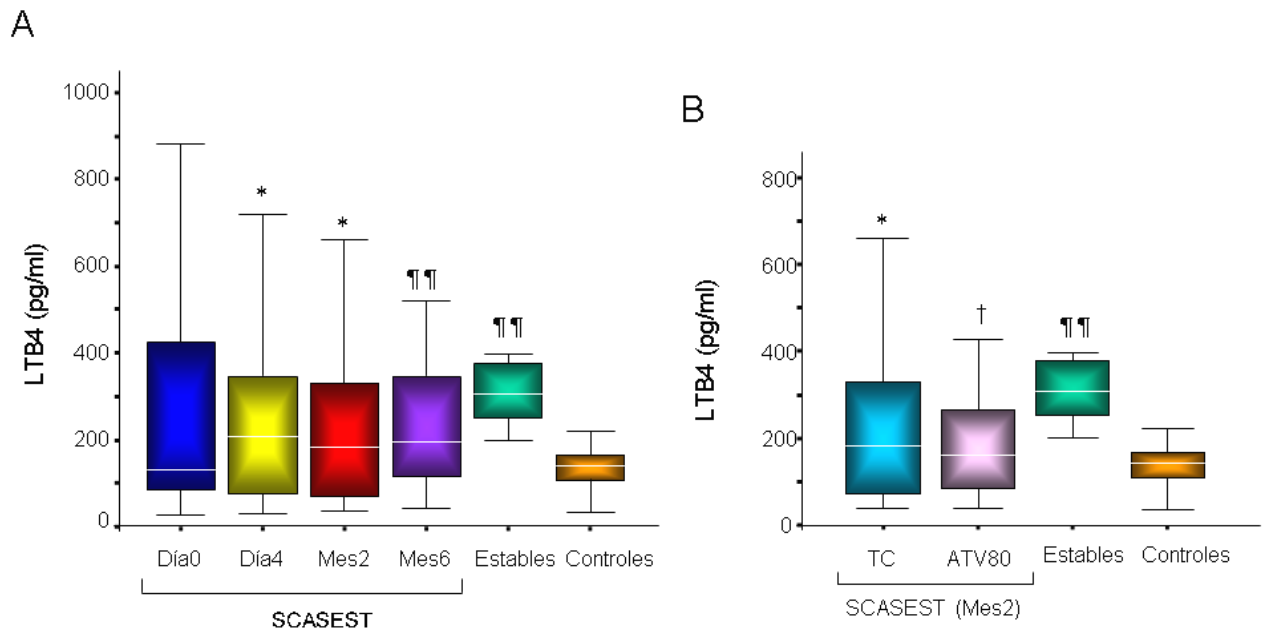
Una vez estudiada la evolución en el tiempo de la actividad gelatinolítica de la MMP-9, analizamos el efecto de la terapia intensiva con atorvastatina durante 2 meses frente a la terapia convencional. El grupo de pacientes con SCASEST que tomaba 80mg/día de atorvastatina presentaba una disminución en la actividad de la MMP-9 respecto al grupo con TC [0.0025 (0.0017-0.0035) vs 0.0280 (0.0057-0.0712) u.a.;  $p=0.030$ ] a los dos meses del tratamiento (Figura 17B). La administración de atorvastatina a altas dosis redujo la actividad proteolítica de la MMP-9 en el plasma de los pacientes con SCASEST a niveles similares a los obtenidos en el plasma de los sujetos control y de los pacientes estables.

## 6.- El tratamiento intensivo con atorvastatina no modula los niveles circulantes de LTB4 en pacientes con SCASEST

El LTB4, producto de la ruta 5-LO/LTA4-H, es un metabolito proinflamatorio implicado en los últimos años, en el desarrollo y mantenimiento de la inflamación en el proceso patológico de la aterosclerosis. Sin embargo, no existen muchos datos en la bibliografía sobre los niveles circulantes de LTB4 en sujetos con SCASEST, por lo que decidimos estudiar qué concentraciones circulantes de LTB4 presentaban en su torrente sanguíneo.

Medimos los niveles circulantes de LTB4 mediante ELISA en las muestras de plasma de los pacientes con SCASEST, coronarios estables y sujetos control. Los niveles plasmáticos de LTB4 en los pacientes con SCASEST a día 0 no mostraron diferencias significativas en relación a los

pacientes estables y a los controles sanos [152(85.2-431.5) pg/ml;  $p=ns$ ] (Figura 19A). En cambio, las medidas realizadas tanto a día 4 [209.9 (77.9-346.5) pg/ml], mes 2 [221.8 (105.6-451.6) pg/ml] y mes 6 [193.7 (92.5-366.8) pg/ml] mostraron un aumento en los niveles circulantes de LTB4 en los pacientes con SCASEST respecto a los controles sanos [132.6 (35.3-165.1) pg/ml;  $p=0.031$ ,  $p=0.025$  y  $p=0.033$  respectivamente]. Por el contrario, obtuvimos valores muy similares de LTB4 circulante en los pacientes estables y en los sujetos con SCASEST; además, los pacientes estables presentaban niveles plasmáticos de LTB4 más altos que los sujetos control [307.6 (253.0-383.2) pg/ml;  $p<0.001$ ].



**Figura 19. Niveles plasmáticos de LTB4 en pacientes con SCASEST, con enfermedad coronaria estable y controles sanos. (A)** Los niveles circulantes de LTB4 se midieron mediante ELISA en el plasma de los pacientes coronarios estables, controles y SCASEST a diferentes tiempos. Los datos correspondientes al Mes 2 y Mes 6 pertenecen a los pacientes con SCASEST randomizados a TC. **(B)** Efecto del tratamiento durante dos meses con altas dosis de atorvastatina (ATV80) en pacientes con SCASEST. Los niveles circulantes de LTB4 están expresados como pg/ml. \* $p<0.05$  vs controles; ††  $p<0.001$  vs controles; †  $p<0.05$  vs estables.

El tratamiento precoz e intensivo con atorvastatina no logró disminuir los valores plasmáticos de LTB4 respecto al grupo con tratamiento convencional, aunque sí encontramos que los niveles circulantes de LTB4 en ambos grupos fueron menores a los obtenidos en los pacientes con enfermedad coronaria estable ( $p=0.0019$ ), y muy similares a los que presentó el grupo control [158.8 (67.1-324.0) pg/ml;  $p=0.101$ ] (Figura 19B).

**Parte II:**

**Implicación de la Vía 5LO/LTB4  
en el desarrollo de la  
aterosclerosis**

## ESTUDIOS In vivo

Como describimos ampliamente en la Introducción, el sistema 5-LO/LTB<sub>4</sub> ha sido implicado en la patogénesis y desarrollo de la enfermedad aterosclerótica. Por lo tanto nuestro grupo se propuso estudiar la expresión de dicha ruta en un grupo de pacientes con aterosclerosis carotídea. Para profundizar en su posible papel inflamatorio y a través de qué mecanismos intracelulares es llevado a cabo, se realizaron estudios *in vitro* en una línea celular monocítica humana, U-937.

### 1.- Diseño del estudio y características clínicas de los pacientes

El estudio fue realizado y aprobado por el Comité Ético de la Fundación Jiménez Díaz (Madrid), de acuerdo a las guías institucionales. El estudio engloba 17 pacientes que ingresaron en la Fundación Jiménez Díaz con una estenosis carotídea  $\geq 70\%$  y que iban a ser sometidos a una endarterectomía carotídea. De cada paciente se recogieron muestras de sangre (plasma y PBMCs) y la placa aterosclerótica extraída. Las características clínicas de los pacientes se muestran en la [Tabla 10](#). El grupo de controles sanos no presentaba ningún factor de riesgo coronario, ni presentaban enfermedad alguna, ni usaban tratamiento crónico de ningún tipo.

	Pacientes (n=17)	Controles (n=19)
Edad (media $\pm$ DE)	64 $\pm$ 8	55 $\pm$ 9
Sexo (♂-♀)	17/2	15/4
Fumador		
- Nunca	11%	-
- Pasado	21%	-
- Actualmente	58%	-
Diabéticos	41%	-
Hipertensos	50%	-
Hipercolesterolémicos	63%	-
Estatinas	75%	-
Antitrombóticos	87%	-
IECAs	47%	-
Insulina	19%	-
Antidiabéticos orales	19%	-
Calcio antagonistas	35%	-

**Tabla 10. Características clínicas de los pacientes con aterosclerosis carotídea  $\geq 70\%$ . IECA:** inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina II.

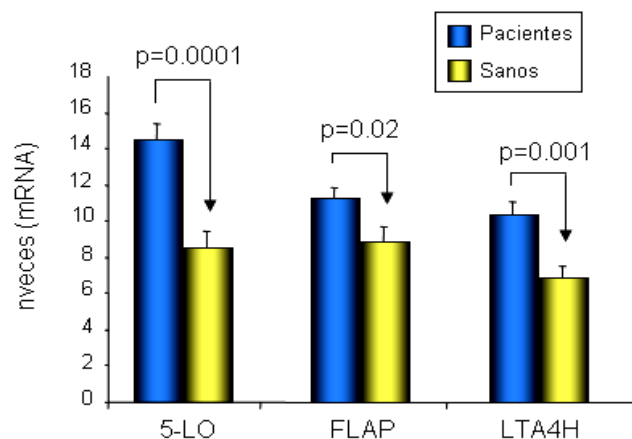
Para las posteriores comparaciones se seleccionó un grupo de sujetos control (n=19) con similar edad y sexo que los pacientes, y que no presentaban factores de riesgo cardiovascular. A éstos sujetos también se les extrajeron muestras de sangre para aislamiento de plasma y PBMCs, para posteriores análisis.

## 2.- Estudios a nivel sistémico en pacientes con aterosclerosis carotídea

### 2.1.-Expresión génica del sistema 5-LO/LTB<sub>4</sub> y de los receptores BLT1 y BLT2 en las PBMCs de pacientes con aterosclerosis carotídea.

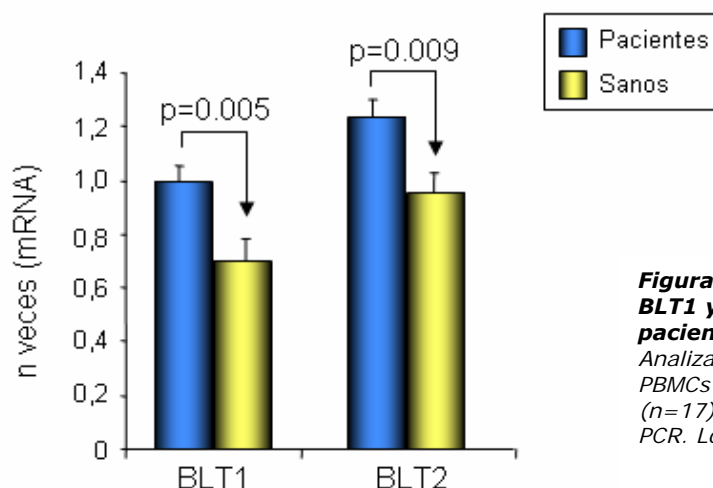
Uno de las estrategias habituales de nuestro laboratorio, ha sido el estudio de las PBMCs y su implicación en las diversas patologías coronarias. En este bloque de resultados analizamos la expresión de la vía 5-LO/LTA<sub>4</sub>H, y los receptores de LTB<sub>4</sub>, BLT1 y BLT2, en las PBMCs de pacientes con aterosclerosis carotídea.

Mediante análisis de Real-Time PCR en las muestras de cDNA conseguido de las PBMCs, observamos un incremento significativo de la expresión génica de las proteínas 5-LO ( $14.5 \pm 0.8$  vs  $8.6 \pm 0.8$  u.a.;  $p=0.0001$ ), FLAP ( $11.3 \pm 0.6$  vs  $8.8 \pm 0.8$  u.a.;  $p=0.02$ ) y LTA<sub>4</sub>-H ( $10.4 \pm 0.7$  vs  $6.9 \pm 0.6$  u.a.;  $p=0.001$ ) en relación con los controles sanos (Figura 20).



**Figura 20. La expresión génica de 5-LO, FLAP y LTA<sub>4</sub>-H está incrementada en las PBMCs de pacientes con aterosclerosis carotídea.** Analizamos la expresión génica de 5-LO, FLAP y LTA<sub>4</sub>-H en las PBMCs de pacientes con aterosclerosis carotídea (n=17) y sujetos control (n=19) mediante Real-Time PCR. Los resultados se expresan como media ± EEM.

Del mismo modo, mediante Real Time-PCR analizamos la expresión de los receptores BLT1 y BLT2 en las PBMCs de los pacientes y de los sujetos control. Los resultados nos muestran que la expresión génica de ambos receptores está incrementada significativamente en los pacientes con aterosclerosis carotídea respecto de los sujetos sanos ( $1.0 \pm 0.05$  vs  $0.7 \pm 0.08$ ; u.a.  $p=0.005$  y  $1.24 \pm 0.06$  vs  $0.9 \pm 0.07$  u.a.;  $p=0.009$ , respectivamente) (Figura 21).



**Figura 21. La expresión génica de los receptores BLT1 y BLT2 está incrementada en las PBMCs de pacientes con aterosclerosis carotídea**  
 Analizamos la expresión génica de BLT1 y BLT2 en las PBMCs de pacientes con aterosclerosis carotídea ( $n=17$ ) y sujetos control ( $n=19$ ) mediante Real-Time PCR. Los resultados se expresan como media ± EEM.

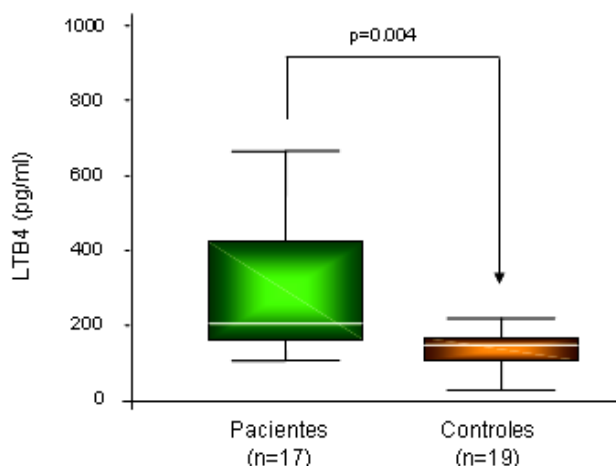
Con estos resultados podemos concluir que el incremento en la expresión de la ruta 5-LO/LTA4H y de los receptores BLT1 y BLT2 en las PBMCs de los pacientes con aterosclerosis carotídea nos indica que estos pacientes presentan un ambiente inflamatorio en la sangre.

## 2.2. -Niveles circulantes de LTB4

Nuestro siguiente objetivo fue medir los niveles plasmáticos de LTB4 en las muestras de plasma obtenidas de los pacientes con aterosclerosis carotídea, así como de los sujetos control. En el apartado anterior hemos observado que la expresión de las enzimas implicadas en la síntesis del LTB4 estaban incrementadas en las PBMCs de los pacientes respecto al grupo control. Por tanto, cabría esperar un aumento LTB4 en el plasma de los mismos respecto a los sujetos sanos. Al cuantificar la cantidad de LTB4 secretado a la sangre de estos pacientes estamos midiendo indirectamente la actividad de las principales enzimas que los producen, la 5-LO y la LTA4H.

Mediante ELISA determinamos las concentraciones de LTB4 circulante en el plasma de los pacientes con aterosclerosis carotídea y del grupo de individuos control. Observamos un incremento significativo en los niveles de LTB4 de los pacientes en relación con el grupo de controles sanos

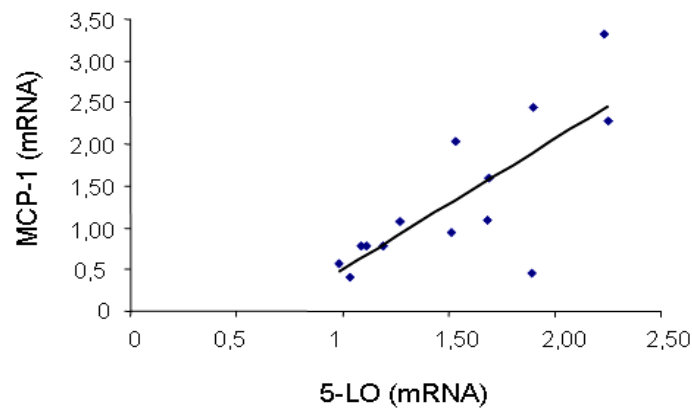
( $290 \pm 48$  pg/mL vs.  $131 \pm 16$  pg/mL;  $p=0.004$ ) (Figura 22). A su vez, observamos que los niveles circulantes de LTB4 no se vieron afectados por el sexo ni la edad.



**Figura 22.- Medida de la concentración en plasma de LTB4.** Gráfica de la concentración plasmática de LTB4 en ambos grupos. Los resultados se expresan como rango de intercuartil.

LTB4 induce el incremento en la expresión de MCP-1 en monocitos humanos<sup>88</sup>, favoreciendo así entre ambos un mayor reclutamiento de células proinflamatorias a las zonas de lesión. Nos planteamos estudiar si podría existir una correlación entre la enzima 5-LO y la expresión de MCP-1 en las PBMCs de los pacientes ateroscleróticos. Como podemos observar en la Figura 23, los resultados nos indican que existe una correlación significativa entre los niveles génicos de la enzima 5-LO y de la quimioquina MCP-1 en las PBMCs de los pacientes con aterosclerosis carotídea ( $r=0,769$ ;  $p<0.001$ ).

Podemos concluir que las muestras de plasma y PBMCs de pacientes con aterosclerosis carotídea presentan un incremento en la expresión génica de las proteínas de la ruta 5-LO/LTA4H y de los receptores BLT1 y BLT2, así como de los niveles circulantes de LTB4 en relación a los sujetos sanos. Este incremento de la batería de proteínas y del producto LTB4 en los monocitos circulantes nos sugiere que estas células ya están activadas antes de entrar en la pared vascular.



**Figura 23.- Correlación entre la expresión génica de la enzima 5-LO y la quimioquina MCP-1 en las PBMCs de los pacientes con aterosclerosis carotídea.** La expresión génica de MCP-1 es directamente proporcional a la expresión génica de la enzima 5-LO ( $r=0.769$ ;  $p<0.001$ ).

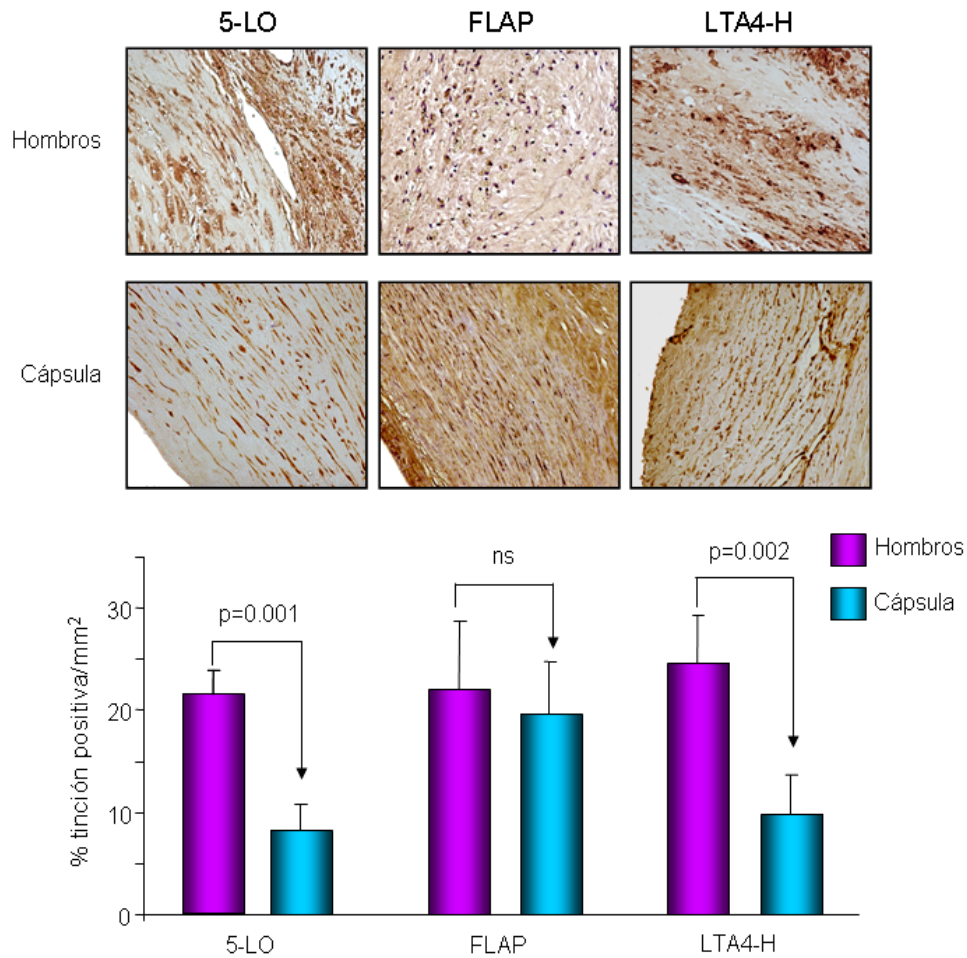
### 3.- Análisis histológico de las placas ateroscleróticas humanas

#### 3.1.-Estudio de la expresión de la ruta 5-LO/LTA4H en las placas carotídeas humanas

Siguiendo con el estudio de las muestras recogidas en los pacientes con aterosclerosis carotídea, nuestro siguiente objetivo fue analizar la expresión de las principales enzimas de la ruta 5-LO/LTA4H, en las placas ateroscleróticas carotídeas. Dichas placas presentan un mayor porcentaje de células inflamatorias (macrófagos y linfocitos T) en el área de los hombros con respecto a la cápsula, mientras que en ésta, las células mayoritarias son las de músculo liso. Para nuestro estudio, elegimos ambas zonas de la placa, hombro y cápsula, para medir la expresión de las proteínas 5-LO, FLAP y LTA4H, mediante inmunohistoquímica.

Observamos un incremento en la expresión de las proteínas 5-LO ( $20.5\pm2.3\%$  vs  $8.7\pm1.7\%$  de tinción positiva/ $\text{mm}^2$ ;  $p=0.001$ ) y LTA4-H ( $21.9\pm2.7\%$  vs  $9.6\pm2.3\%$  de tinción positiva/ $\text{mm}^2$ ;  $p=0.002$ ) en la región de los hombros con respecto a la cápsula (Figura 24). En cambio, la expresión de FLAP fue muy similar en ambas zonas estudiadas ( $21.3\pm6.15\%$  vs  $19.7\pm4.8\%$  de tinción positiva/ $\text{mm}^2$ ;  $p=\text{ns}$ ).



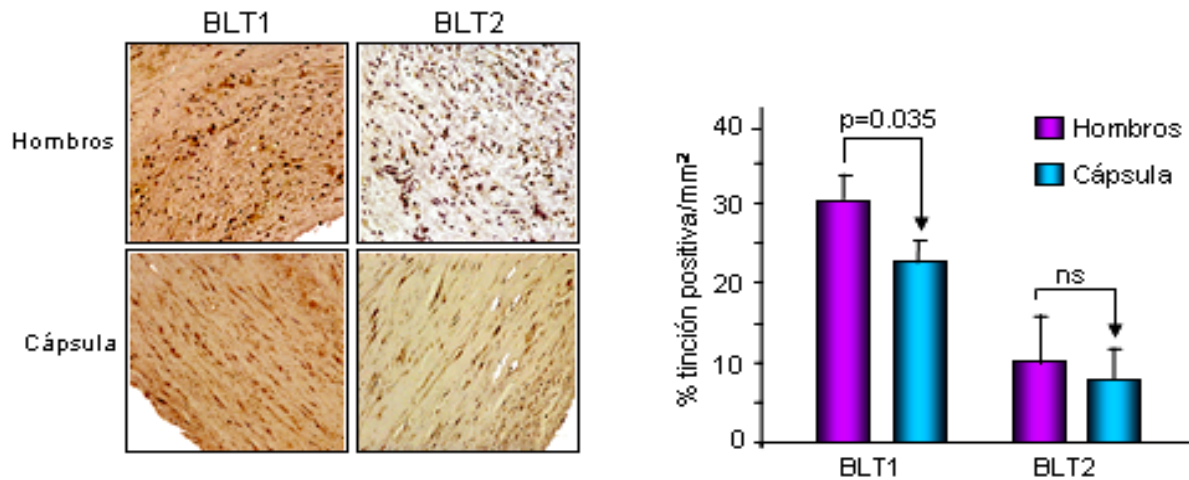


**Figura 24. Expresión de 5-LO, FLAP y LTA4-H en las placas carotídeas de pacientes.** Ejemplos representativos de las inmunohistoquímicas de 5-LO, FLAP y LTA4-H en las dos regiones estudiadas de la placa carotídea (los hombros y la cápsula) de pacientes con aterosclerosis carotídea (n=17). Las fotografías muestran una ampliación de 400x. En la parte inferior se muestra la cuantificación histológica expresada como % tinción positiva/mm² en las dos regiones.

### 3.2.-Estudio de la expresión de los receptores BLT1 y BLT2 en las placas carotídeas humanas

Los múltiples efectos de LTB4 pueden explicarse a través de la unión a sus receptores de membrana, el BLT1 y el BLT2, por lo que nuestro siguiente paso fue analizar la distribución que presentaban ambos receptores en la zona de los hombros respecto de la zona de la cápsula, en las placas carotídeas de los pacientes. Mediante inmunohistoquímica, observamos un aumento significativo en la expresión de BLT1 ( $29.9 \pm 3.7\%$  vs  $22.5 \pm 2.3\%$  de tinción positiva/mm²;  $p = 0.035$ ), pero no de BLT2 ( $8.3 \pm 2.3\%$  vs  $5.6 \pm 1.4\%$  de tinción positiva/mm²;  $p=0.32$ ) en la región de los hombros en relación con la cápsula en las placas ateroscleróticas (Figura 25). Por lo tanto, la zona

más vulnerable de las placas ateroscleróticas, los hombros, presenta un incremento significativo en la expresión de 5-LO, LTA4-H y BLT1, pudiendo contribuir al incremento de la inflamación en las placas ateroscleróticas.



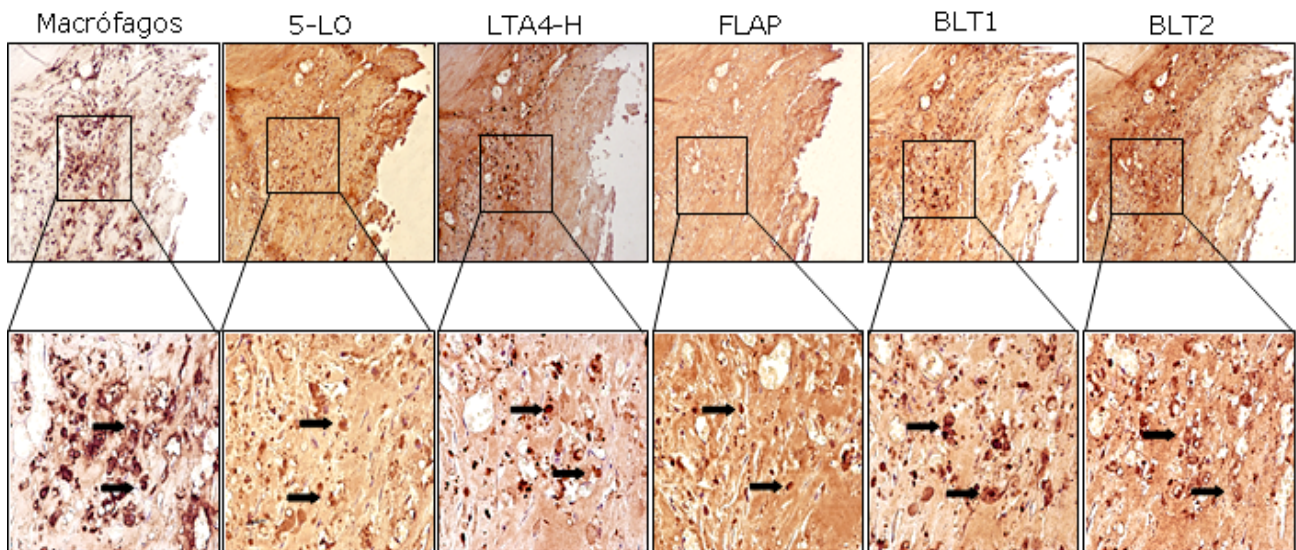
**Figura 25. Expresión de los receptores BLT1 y BLT2 en las lesiones carotídeas humanas.** Ejemplos representativos de las inmunohistoquímicas de BLT1 y BLT2 en la región de los hombros y la cápsula en las placas carotídeas de pacientes con aterosclerosis carotídea (n=17). Las fotografías muestran una ampliación de 400x. En la parte derecha de la figura se muestra la gráfica correspondiente al % de tinción positiva/mm² de BLT1 y BLT2 en las dos regiones estudiadas.

### 3.3.- Localización de la expresión de 5-LO, FLAP, LTA4-H y los receptores BLT1 y BLT2 en placas carotídeas humanas

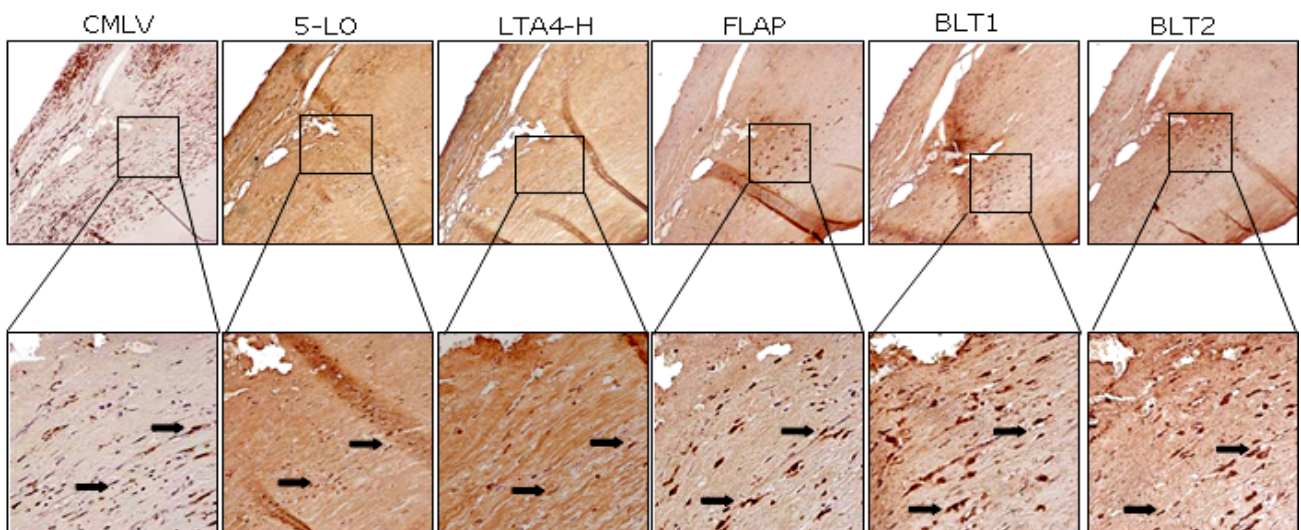
Ya que tanto los receptores BLT1 y BLT2, como las proteínas de la ruta 5-LO/LTB4 están expresados en las placas ateroscleróticas carotídeas, nuestro siguiente objetivo fue determinar qué tipos celulares, de los que se encontraban en las placas, eran los encargados de expresar estas proteínas.

Realizamos cortes seriados de los mismos especímenes de endarterectomía y mediante inmunohistoquímica estudiamos la expresión de macrófagos, CMLV, 5-LO, FLAP, LTA4-H, BLT1 y BLT2. Comprobamos que tanto macrófagos (Figura 26A) como CMLV (Figura 26B) expresan todas las proteínas de la ruta, al igual que los receptores BLT1 y BLT2. Además, se observó que dichos receptores colocan con las enzimas de la ruta de síntesis del LTB4, lo que nos indica que estas moléculas son sintetizadas por las mismas células. En este sentido, el hecho de que las mismas células expresen a la vez las enzimas y los receptores nos hace pensar que la síntesis de LTB4 puede ejercer un mecanismo de feed-back positivo sobre las propias células que lo sintetizan, y potenciar así su efecto inflamatorio.

A



B



**Figura 26. Colocalización de 5-LO, FLAP, LTA4-H, BLT1 y BLT2 con macrófagos(A) y CMLV (B).**  
**(A)** En cortes seriados de la misma muestra se realizaron simultáneamente inmunohistoquímicas para 5-LO, FLAP, LTA4-H, BLT1, BLT2 y macrófagos. En la parte inferior se muestra una magnificación (x400) de la zona indicada. **(B)** Del mismo modo se realizaron inmunohistoquímicas para 5-LO, FLAP, LTA4-H, BLT1, BLT2 y CMLV. En la parte inferior se muestra una magnificación (x400) de la zona indicada. El símbolo ➡ indica las células que expresan todas las proteínas indicadas.

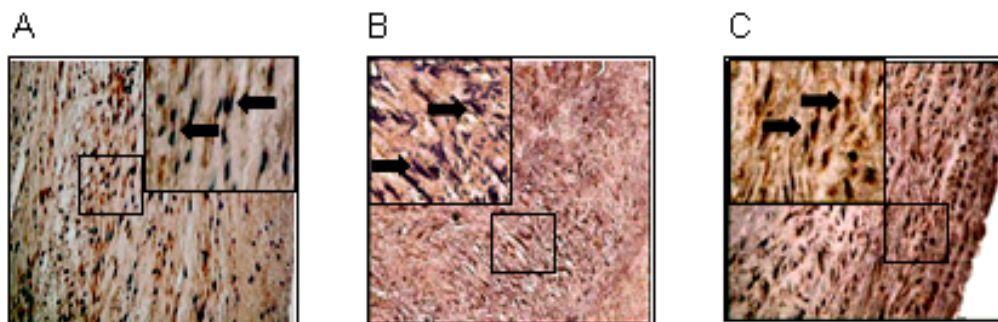


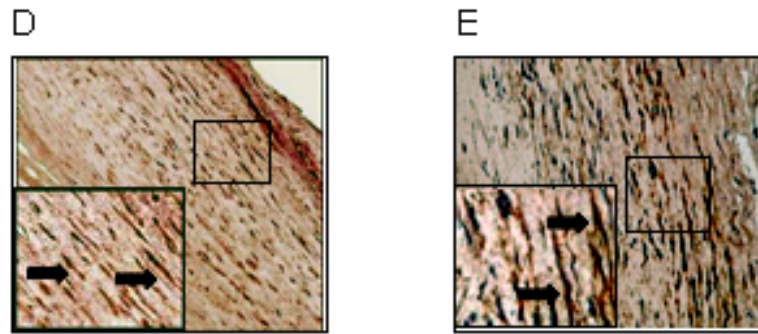
### 3.4.-Colocalización de las proteínas de la ruta 5-LO/LTB<sub>4</sub> y los receptores BLT1 y BLT2 con el factor de transcripción NF- $\kappa$ B en placas ateroscleróticas humanas

Datos de la bibliografía indican que las proteínas del sistema 5-LO/LTB<sub>4</sub>, así como los receptores de LTB<sub>4</sub>, presentan en su región promotora sitios de unión para el factor de transcripción NF- $\kappa$ B, sugiriendo que dicho factor podría estar implicado en la regulación de estos genes<sup>51,86</sup>. Estudios previos realizados en nuestro laboratorio con este grupo de pacientes demostraron que la activación de NF- $\kappa$ B estaba aumentada en las PBMCs y en la región de los hombros de las placas ateroscleróticas carotídeas extraídas de los mismos<sup>127</sup>. Como hemos visto en las inmunohistoquímicas de las placas carotídeas anteriormente, estos pacientes también presentan en la zona de los hombros, aumento en la expresión de las proteínas 5-LO, LTA<sub>4</sub>H y BLT1. Con estos datos nos propusimos evaluar si se producía expresión simultánea de todos estos parámetros en la placa, es decir, si podría haber colocalización del NF- $\kappa$ B activo junto con nuestras proteínas estudio. Para ello realizamos la técnica del Southwestern histochemistry, que nos permite ver el NF- $\kappa$ B activo (tinción azulada en el núcleo), seguida de la inmunohistoquímica correspondiente para las proteínas, 5-LO, FLAP, LTA<sub>4</sub>-H, BLT1 y BLT2, que proporciona una tinción marrón en el citoplasma.

En la [Figura 27](#), se puede observar una colocalización del NF- $\kappa$ B activo con 5-LO, FLAP, LTA<sub>4</sub>-H, BLT1 y BLT2, sugiriendo que la activación de este factor nuclear podría estar implicada en la regulación transcripcional de estas proteínas *in vivo*.

Con estos resultados demostramos que el incremento en la expresión de la ruta de la 5-LO y de los receptores podría estar favoreciendo la activación *in situ* del factor nuclear NF- $\kappa$ B, potenciando todo ello el aumento de la inflamación de la placa y la vulnerabilidad de la misma.





**Figura 27. Colocalización de NF- $\kappa$ B con 5-LO, FLAP, LTA4-H, BLT1 y BLT2.** Colocalización simultánea en placas ateroscleróticas humanas de NF- $\kappa$ B activo (tinción azulada en el núcleo) y de 5-LO (A), FLAP (B), LTA4-H (C), BLT1 (D) y BLT2 (E) (tinción marrón en el citoplasma). En la parte inferior izquierda de cada fotografía se muestra una magnificación (x400) de la zona indicada.

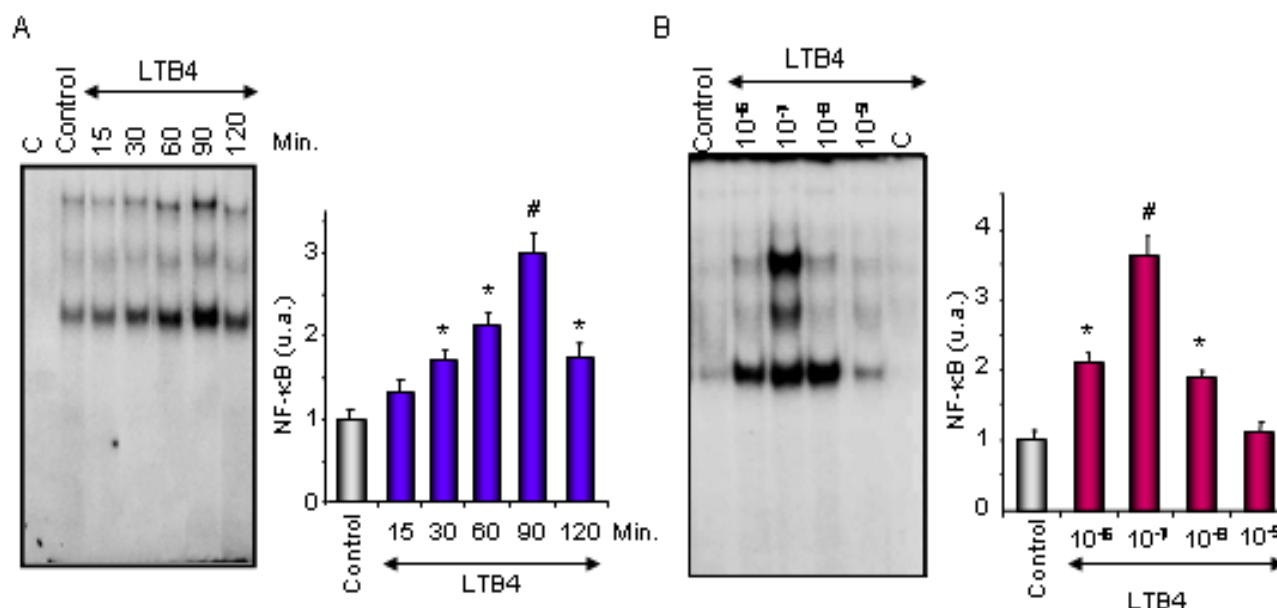
## **ESTUDIOS In vitro**

En los estudios realizados con las muestras de pacientes con aterosclerosis carotídea hemos demostrado que el metabolito LTB<sub>4</sub>, producto de la vía 5-LO/LTA<sub>4</sub>H, está aumentado en el plasma de estos pacientes respecto a los sujetos control. Además, en las PBMCs y en las placas ateroscleróticas encontramos un incremento en la expresión de proteínas clave de la ruta y de los receptores del LTB<sub>4</sub>. Con el propósito de profundizar en el papel del LTB<sub>4</sub> y su implicación en la patología vascular, estudiamos las vías de señalización disparadas a través de la unión a sus receptores y los principales efectos producidos en células monocíticas humanas en cultivo U-937.

### **1.- LTB<sub>4</sub> activa NF- $\kappa$ B en células monocíticas U-937**

Como ya hemos mencionado anteriormente, uno de los principales factores de transcripción proinflamatorios implicados en la enfermedad aterosclerótica es el NF- $\kappa$ B. Dicho factor juega un papel fundamental en la transducción de las señales inflamatorias que conducen a la activación de distintos tipos celulares, entre ellos los monocitos. Centramos nuestros estudios *in vitro* en este tipo celular debido a su gran implicación en el desarrollo de las patologías vasculares. Además, los estudios realizados en placas de pacientes con aterosclerosis carotídea nos han demostrado que dicho factor nuclear se encuentra activo y colocalizando con las principales proteínas de nuestro estudio. Por todo ello, nos propusimos estudiar en la línea monocítica humana U-937 los efectos inflamatorios provocados por el tratamiento con LTB<sub>4</sub>.

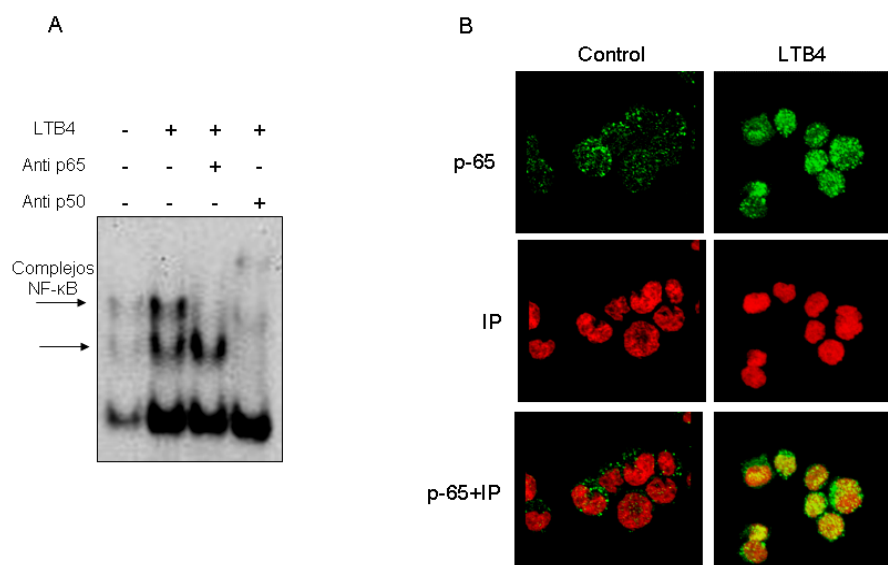
En primer lugar analizamos si podría existir un efecto directo del LTB<sub>4</sub> en la transactivación de NF- $\kappa$ B en monocitos U-937. Incubamos las células a diferentes tiempos (desde 0h hasta 2h) y con distintas dosis (desde  $10^{-6}$  hasta  $10^{-9}$  mol/L) de LTB<sub>4</sub>. En la [figura 28A](#) se muestra que LTB<sub>4</sub> fue capaz de aumentar significativamente a los 30min la actividad de unión al DNA de NF- $\kappa$ B ( $p < 0.005$  vs control), consiguiendo la mayor actividad a los 90min ( $p < 0.001$  vs control). Esta activación fue dependiente tanto del tiempo ([Figura 28A](#)), como de la dosis ([Figura 28B](#)), consiguiéndose la mayor actividad a dosis de  $10^{-7}$  mol/L ( $p < 0.001$  vs control). Con estos resultados decidimos utilizar la dosis de  $10^{-7}$  mol/L para posteriores experimentos.



**Figura 28. LTB4 activa NF-κB de manera dependiente del tiempo y de la dosis en monocitos humanos U-937.** Las células se trataron a diferentes tiempos (A) y dosis (B) y mediante EMSA se analizó la actividad de unión al DNA de NF-κB. En la parte izquierda de cada figura se muestra un EMSA representativo y en la parte derecha la gráfica correspondiente a los valores medios  $\pm$  EEM de 4-5 experimentos diferentes. \*  $p < 0.005$  vs control; #  $p < 0.001$  vs control. Los ensayos de competición (C) están hechos con 100 veces un exceso de NF-κB sin marcar.

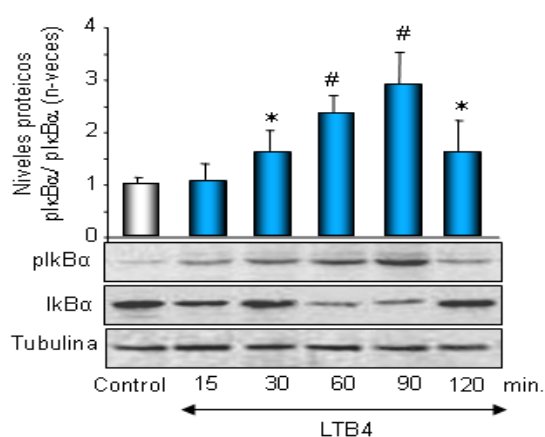
Los resultados nos muestran que el NF-κB es capaz de aumentar su actividad en respuesta a LTB4 de manera temprana. Es sabido que la familia de NF-κB la componen diferentes miembros que en respuesta a estímulos externos dimerizan y se translocan al núcleo para unirse a los promotores de sus genes diana y así activar la transcripción de los mismos. Estos dímeros pueden estar formados por diferentes miembros de la familia de NF-κB y dependiendo del tipo de estímulo se activan unos u otros y dan lugar a distintas respuestas<sup>86,136</sup>. Nuestro siguiente paso fue averiguar que subunidades eran las que participaban en dicho efecto.

Incubamos extractos nucleares de monocitos U-937 tratados con LTB4 a dosis de  $10^{-7}$  mol/L durante 90 min. Mediante ensayos de super-retardo observamos que los anticuerpos frente a las subunidades p50 y p65, retardan ambas bandas a un peso molecular mayor, mostrando que el complejo NF-κB activado por LTB4 está formado por el heterodímero p50/p65 (Figura 29A). Mediante ensayos de inmunofluorescencia, comprobamos que las células control mostraban una inmunofluorescencia citoplasmática difusa con el anticuerpo p65. Cuando tratamos las células con LTB4 observamos una fluorescencia nuclear intensa demostrando translocación nuclear de la subunidad p65 del NF-κB (Figura 29B).



**FIGURA 29. Identificación de los complejos NF- $\kappa$ B inducidos por LTB4 en monocitos.** **A)** La figura muestra un EMSA representativo donde se observan las bandas de superretardo frente a los anticuerpos anti-p50 y anti-p65. **B)** Localización de las subunidades de NF- $\kappa$ B en monocitos U937 tratados con LTB4 ( $10^{-7}$  mol/L) durante 90 min. Inmunofluorescencia realizada con el anticuerpo anti-p65 (tinción verde), y para ver la integridad del núcleo utilizamos yoduro de propidio (IP) (tinción roja). La mezcla de ambas tinciones se muestra en la parte inferior.

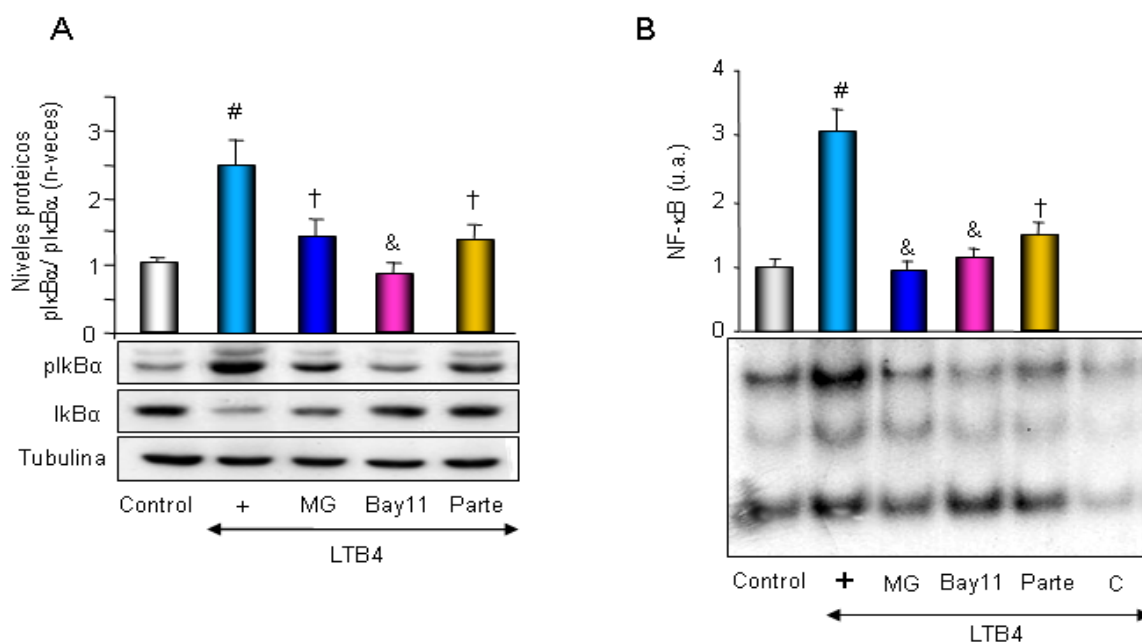
La activación de NF- $\kappa$ B implica la fosforilación y disociación de I $\kappa$ B $\alpha$ , su subunidad inhibitoria, y su posterior degradación. A este respecto su fosforilación y degradación puede ser considerada como un marcador de la activación de NF- $\kappa$ B. En células control, mediante ensayos de Western blot, observamos la presencia de I $\kappa$ B $\alpha$  en la fracción citosólica. Después de incubarlas con LTB4 observamos que se produce un incremento en la presencia de la forma fosforilada de dicha proteína y un descenso en la forma total, que indica su posterior degradación (Figura 30). Estos eventos están correlacionados con la translocación nuclear del heterodímero p50/p65 (Figura 29B) y con la cinética de activación de NF- $\kappa$ B inducida por LTB4 (Figura 28A).



**FIGURA 30. Efecto de LTB4 en los niveles citosólicos de I $\kappa$ B $\alpha$  e I $\kappa$ B $\alpha$ -fosforilado (pI $\kappa$ B $\alpha$ ) en monocitos.** Tratamos las células con LTB4 ( $10^{-7}$  mol/L) a diferentes tiempos. La figura muestra en la parte inferior los Western blot representativos de anti-pI $\kappa$ B $\alpha$ , anti-I $\kappa$ B $\alpha$ , y tubulina y en la parte superior se muestra la media  $\pm$  EEM de 5 experimentos. \* $p < 0.05$  vs control, # $p < 0.001$  vs control.



Para corroborar la implicación de NF- $\kappa$ B en la señalización inducida por LTB<sub>4</sub>, utilizamos distintos inhibidores de dicho factor nuclear: MG-132, inhibidor del proteosoma, Bay117082, inhibidor de la fosforilación de la subunidad I $\kappa$ B $\alpha$  y partenolide, inhibidor de la ruta IKK/NF- $\kappa$ B. Preincubamos los monocitos durante 1h con estos inhibidores y posteriormente los tratamos con LTB<sub>4</sub>. En los extractos citosólicos recogidos, comprobamos mediante ensayos de Western blot que las células en presencia del inhibidor MG-132, presentan bajos niveles en la expresión de la proteína I $\kappa$ B $\alpha$ , y altos niveles en la expresión de su forma fosforilada (Figura 31A). En cambio, en presencia de Bay117082, se inhibió la fosforilación de I $\kappa$ B $\alpha$ , pasando lo mismo cuando las células estaban en presencia de partenolide (Figura 31A). Además, mediante ensayos de EMSA realizados con los extractos proteicos nucleares recogidos de las células tratadas con los mismos inhibidores NF- $\kappa$ B antes mencionados, observamos que el MG-132, el Bay-117082 y el partenolide disminuyeron significativamente, llegando casi a normalizar los niveles de actividad de unión al DNA de NF- $\kappa$ B ( $p < 0.005$  vs LTB<sub>4</sub> para MG-132 y Bay117082, y  $p < 0.05$  vs LTB<sub>4</sub> para partenolide) (Figura 31B). Así, se correlacionaba la inhibición de la fosforilación de I $\kappa$ B $\alpha$  con la disminución en la actividad de unión de NF- $\kappa$ B al DNA.



**FIGURA 31. La activación de NF- $\kappa$ B inducida por LTB<sub>4</sub> en monocitos es atenuada por inhibidores de NF- $\kappa$ B.** Pretratamos las células con MG132 (MG), Bay-117032 (Bay11), y partenolide (parte) a una concentración de  $10^{-5}$  mol/L en todos los casos y posteriormente las incubamos 90min con LTB<sub>4</sub> ( $10^{-7}$  mol/L). **A)** La figura muestra en la parte inferior un Western blot representativo de anti-pI $\kappa$ B $\alpha$ , anti-I $\kappa$ B $\alpha$ , y tubulina y en la parte superior la media $\pm$ EEM de 5 experimentos. **B)** En la parte inferior se muestra un gel representativo de EMSA y en la superior la media $\pm$ EEM de 5 experimentos. Los ensayos de competición (C) están hechos con 100 veces un exceso de NF- $\kappa$ B sin marcar. #  $p < 0.001$  vs control; †  $p < 0.05$  vs LTB<sub>4</sub>; &  $p < 0.005$  vs LTB<sub>4</sub>

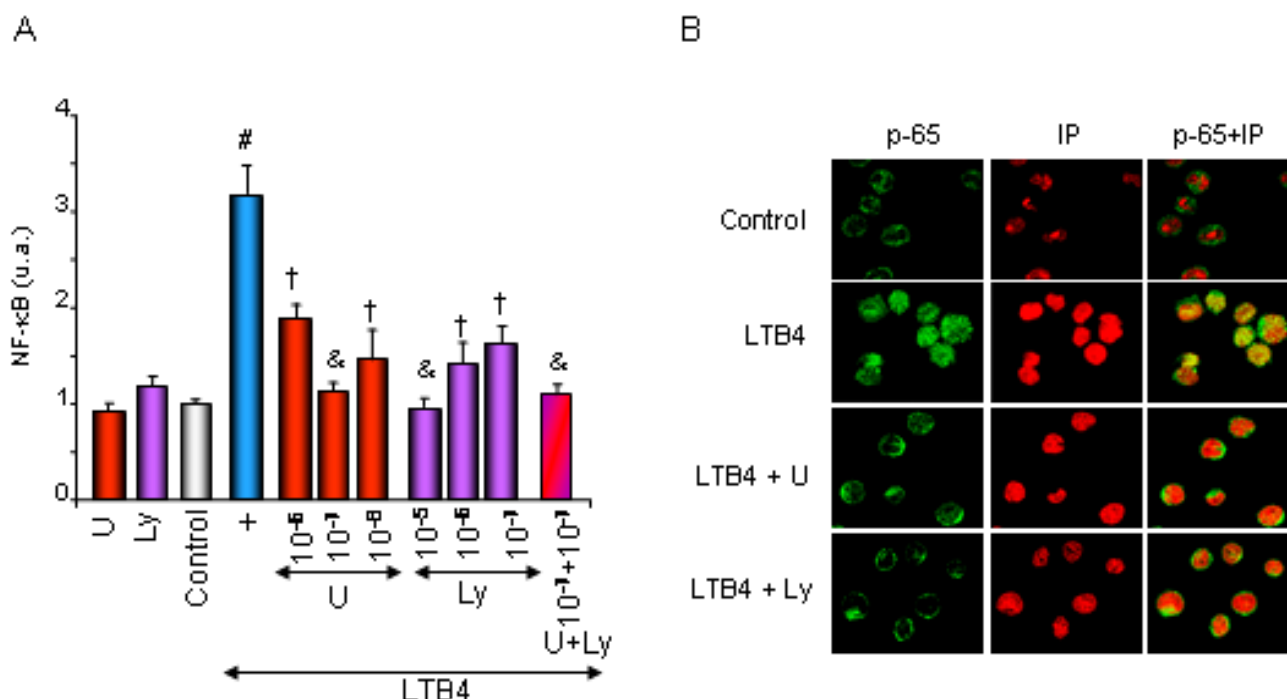
### 1.1.- LTB4 activa NF- $\kappa$ B vía BLT1 y BLT2

A continuación realizamos ensayos de EMSA en presencia de antagonistas selectivos de los receptores BLT1 y BLT2 para investigar el grado de participación de cada uno de ellos en el aumento de la actividad de unión al DNA de NF- $\kappa$ B. Preincubamos los monocitos con U-75302, antagonista selectivo de BLT1 y Ly-255283, antagonista selectivo de BLT2 y posteriormente los estimulamos durante 90min. con LTB4. Los resultados obtenidos muestran que se produce una inhibición dosis dependiente en la activación de NF- $\kappa$ B con el tratamiento tanto con el antagonista de BLT1, U-75302, como con el de BLT2, Ly-255283, en monocitos U-937 tratados con LTB4 (Figura 32A). Las dosis elegidas para realizar las curvas de concentraciones de ambos antagonistas se corresponden con los datos existentes en la bibliografía, donde está demostrado que los valores de IC<sub>50</sub> para U-75302 son 1 $\mu$ M para BLT1 y >10mM para BLT2, y el valor de IC<sub>50</sub> para Ly255283 es 10 $\mu$ M para BLT1 y 1 $\mu$ M para BLT2<sup>123</sup>.

El antagonista de BLT1 a la dosis de 10<sup>-7</sup>mol/L, y el antagonista de BLT2 a dosis de 10<sup>-5</sup>mol/L, consiguieron el mayor efecto en la inhibición de la activación del factor nuclear NF- $\kappa$ B (p<0.005 vs LTB4) (Figura 32A). La dosis de U-75302 es específica para BLT1. En cambio, la dosis de mayor efecto para Ly-255283, no es específica de BLT2, por lo que decidimos elegir la dosis de 10<sup>-7</sup> mol/L, para asegurarnos que la inhibición era específica de BLT2.

Para demostrar si se producía un efecto aditivo en la inhibición de NF- $\kappa$ B a través de los dos receptores, tratamos los monocitos con ambos antagonistas conjuntamente. No se produjo mayor inhibición de NF- $\kappa$ B, por lo que descartamos el efecto sumatorio del tratamiento con ambos antagonistas (p<0.005 vs LTB4) (Figura 32A). Por otro lado, el tratamiento de los monocitos con ambos antagonistas por separado únicamente, no ejerció ningún efecto sobre la activación de NF- $\kappa$ B por lo que descartamos que funcionasen como agonistas.

Estudios adicionales mediante técnicas de inmunofluorescencia nos mostraron que el tratamiento de los monocitos durante 1h con U-75302 (10<sup>-7</sup>mol/L) y con Ly-255283 (10<sup>-7</sup>mol/L) y la posterior adición al medio de LTB4 (10<sup>-7</sup>mol/L) durante 90min. disminuyó la intensidad de fluorescencia nuclear de la subunidad p65 del NF- $\kappa$ B, inhibiendo por tanto la translocación de la misma al interior del núcleo. En cambio, cuando las células estaban tratadas con LTB4 se aprecia una intensa fluorescencia tanto citoplásmica como nuclear mostrando translocación nuclear de la subunidad p65 y activación de NF- $\kappa$ B (Figura 32B).

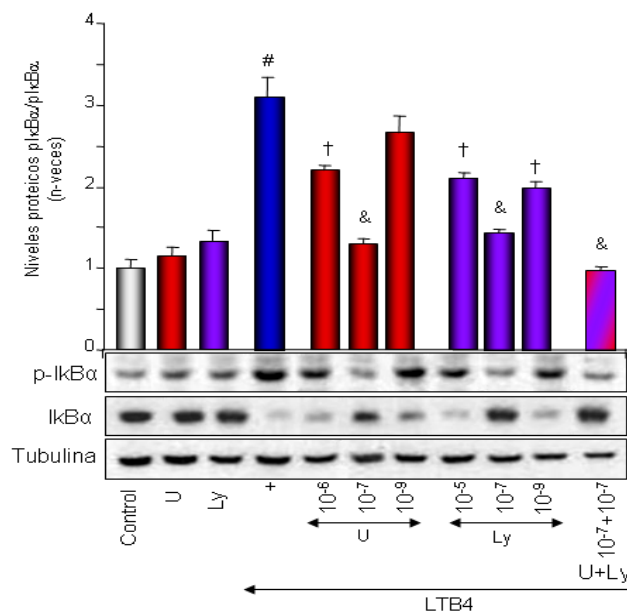


**FIGURA 32. LTB4 activa NF-κB a través de los receptores BLT1 y BLT2 en monocitos U-937.** Los monocitos fueron preincubados durante 1h con los antagonistas de los receptores BLT1, U-75302 (U) y BLT2, Ly-255283 (Ly) a distintas dosis y posteriormente tratados durante 90min. con LTB4 (10<sup>-7</sup>mol/L). **(A)** La figura muestra los valores de la media±EEM de 4-5 experimentos de EMSA diferentes. #  $p < 0.001$  vs control; †  $p < 0.05$  vs LTB4 y &  $p < 0.005$  vs LTB4. **(B)** Localización de la subunidad p65 de NF-κB en monocitos. Las dosis utilizadas de los antagonistas son 10<sup>-7</sup>mol/L para ambos. Inmunofluorescencia realizada con el anticuerpo anti-p65 (tinción verde) e ioduro de propidio (IP) para ver la integridad de los núcleos (tinción roja). En la parte derecha del panel se muestra la mezcla de ambas tinciones.

Como hemos mencionado anteriormente, la activación de NF-κB implica la fosforilación y disociación de IκBα, su subunidad inhibitoria, y su posterior degradación, por lo que quisimos averiguar si la inhibición de la señalización de LTB4 a través de la unión a sus receptores era capaz de inhibir dicha fosforilación. Realizamos ensayos de Western blot con los extractos citosólicos de monocitos humanos preincubados con diferentes dosis de los antagonistas de BLT1 y BLT2, U-75302 (dosis entre 10<sup>-6</sup> y 10<sup>-9</sup> mol/L) y Ly-255283 (dosis entre 10<sup>-5</sup> y 10<sup>-9</sup> mol/L) respectivamente y posteriormente tratados con LTB4 (10<sup>-7</sup> mol/L) durante 90 min. En la [figura 33](#) podemos observar que el tratamiento con el antagonista de BLT1 a la dosis de 10<sup>-7</sup> mol/L (misma dosis con la que se consiguió la mayor inhibición en la actividad de unión de NF-κB al DNA), inhibe casi completamente la fosforilación de la subunidad IκBα, inhibiéndose por tanto la activación de NF-κB ( $p < 0.005$  vs LTB4). El tratamiento con el antagonista BLT2, también inhibió la fosforilación de la subunidad IκBα inducida por el tratamiento con LTB4 en monocitos ( $p < 0.005$  vs LTB4) ([Figura 33](#)). Cuando tratamos las células con ambos antagonistas, observamos que no se produjo efecto aditivo en la inhibición de la fosforilación de IκBα ( $p < 0.005$  vs

LTB4). Además, el tratamiento con U-75302 y Ly-255283 solos, no produjo ningún efecto en la fosforilación de dicha subunidad.

Estos resultados nos sugieren que la modulación de LTB4 a través de BLT1 y BLT2, es capaz de disminuir la fosforilación de la subunidad  $I\kappa B\alpha$ , inhibir la translocación de la subunidad p65 al interior nuclear y como consecuencia de todo esto, disminuir la actividad de unión de NF- $\kappa$ B al DNA.



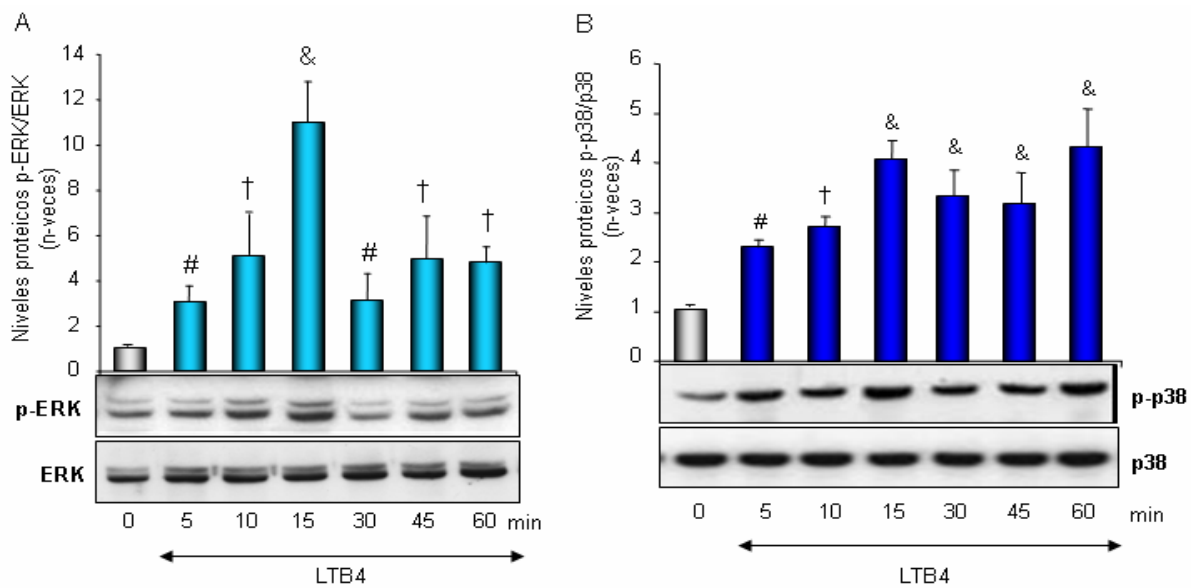
**FIGURA 33. El tratamiento con antagonistas de BLT1 y BLT2 modula la fosforilación de la subunidad inhibitoria  $I\kappa B\alpha$  inducida por LTB4 en monocitos humanos.** Pretratamos las células con U-75302 (U) (dosis entre 10<sup>-6</sup> y 10<sup>-9</sup> mol/L) y Ly-255283 (Ly) (dosis entre 10<sup>-5</sup> y 10<sup>-9</sup> mol/L), antagonistas de BLT1 y BLT2 respectivamente, y posteriormente los tratamos con LTB4 (10<sup>-7</sup> mol/L) durante 90min. Recogimos los extractos citosólicos y realizamos Western blot con los anticuerpos p-I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\alpha$  y tubulina. En la parte inferior de la figura se muestran fotografías representativas de los Western blot. En la parte superior se muestra la gráfica con los valores de la media $\pm$ EEM de 5 experimentos diferentes. #  $p < 0.001$  vs control; †  $p < 0.05$  vs LTB4; &  $p < 0.005$  vs LTB4.

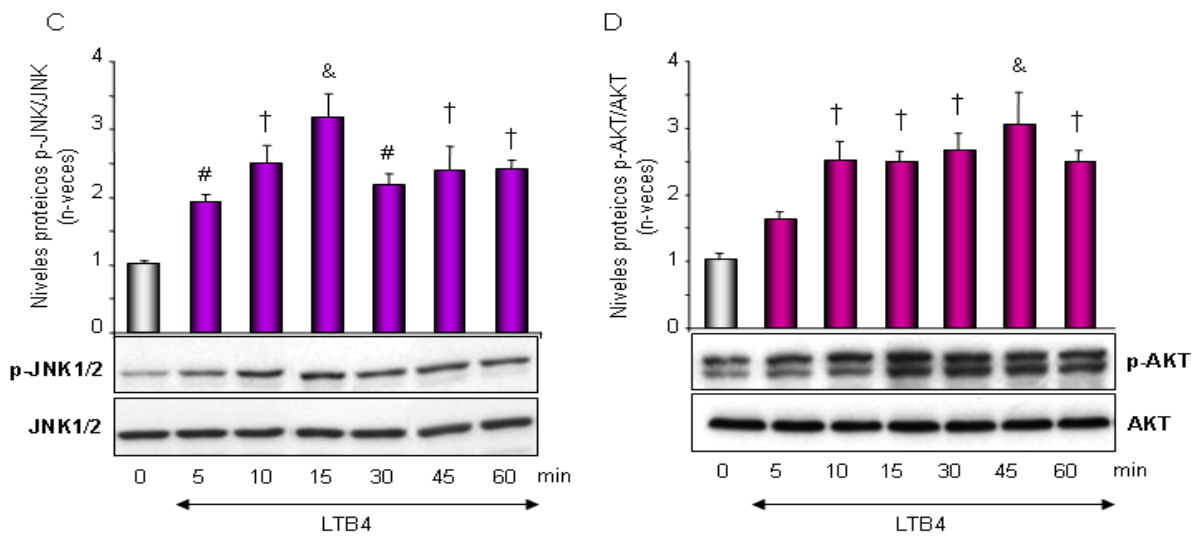
## 2.-Mecanismos de activación de NF- $\kappa$ B en respuesta a LTB4

Con el propósito de seguir profundizando en los mecanismos intracelulares a través de los cuales el LTB4 vía BLT1 y BLT2 es capaz de inducir activación de NF- $\kappa$ B, usamos inhibidores de las rutas de las MAPK, PI3K/AKT y del NF- $\kappa$ B. Existen datos en la bibliografía de que la unión de LTB4 a sus receptores BLT1 y/o BLT2 activa las rutas de las MAPK y la PI3k/Akt en una gran variedad de sistemas experimentales<sup>88,89,183,205</sup>. Además, la activación de estas quinasas activa NF- $\kappa$ B, induciendo la transcripción de genes.

En primer lugar nos propusimos averiguar qué rutas de MAPKs era capaz de activar LTB4 en monocitos humanos en cultivo. Puesto que la activación de MAPK es dependiente de la fosforilación en serina/treonina por las respectivas MAPK quinasas situadas más arriba en la cascada de

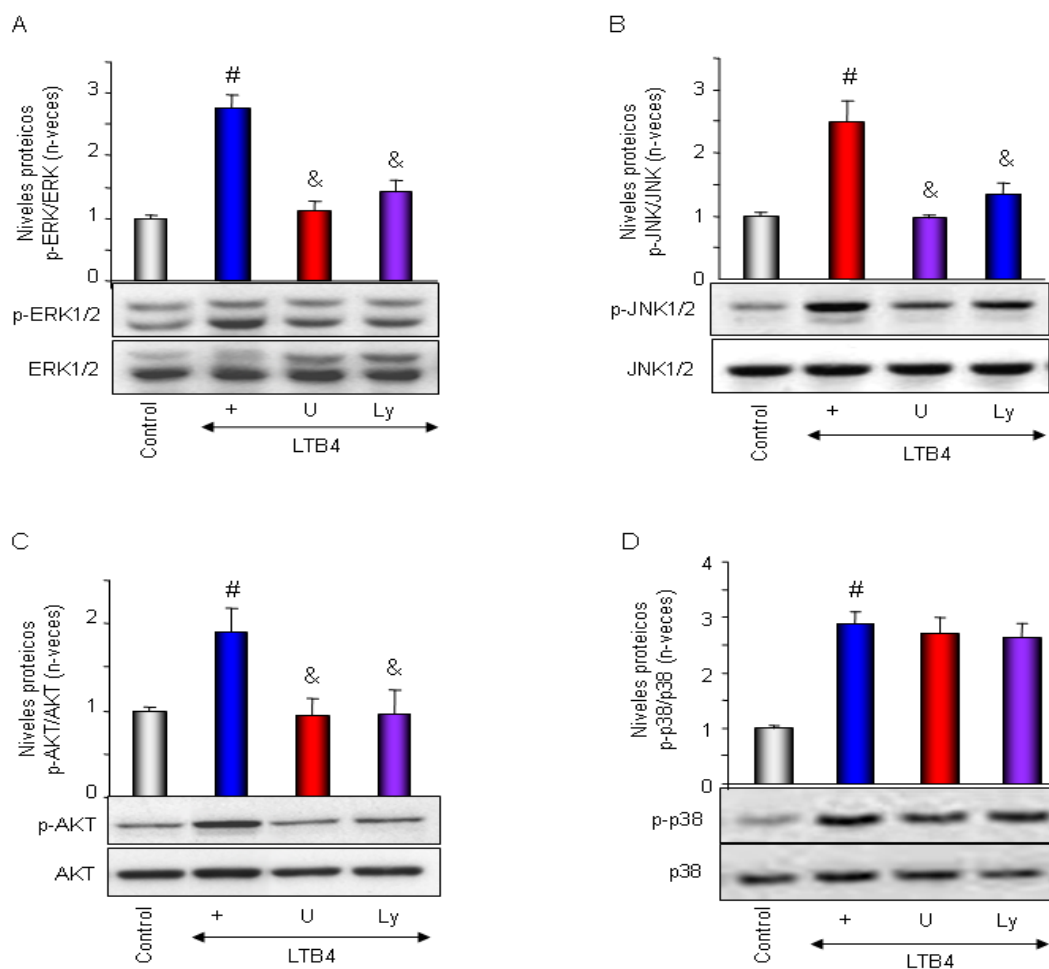
señalización, hicimos Western blot usando Ac específicos para p-ERK, p-p38, p-JNK1/2 y p-AKT. Como se muestra en la [Figura 34](#), el tratamiento de los monocitos con LTB<sub>4</sub> a una dosis de  $10^{-7}$  mol/L durante diferentes tiempos induce la fosforilación de ERK después de 5 min de estimulación ( $p < 0.05$  vs 0min), con un máximo a los 15 min ( $p < 0.005$  vs 0min) y descendiendo drásticamente a los 30min ( $p < 0.05$  vs 0min) ([Figura 34A](#)). El patrón de fosforilación de p38 fue muy similar al de ERK consiguiendo su máximo a los 15min de estimulación con LTB<sub>4</sub> ( $p < 0.005$  vs 0min), aunque esa activación se mantuvo sostenida hasta transcurrida 1h ([Figura 34B](#)). En el caso de la JNK1/2, se obtuvo el pico de fosforilación a los 15min. ( $p < 0.005$  vs 0min) bajando progresivamente pero manteniéndose más elevada que en niveles basales, después de 1h de tratamiento ([Figura 34C](#)). El patrón de fosforilación de AKT fue muy parecido al de p38, presentando niveles de fosforilación elevados ya a los 10min de tratamiento con LTB<sub>4</sub> ( $p < 0.005$  vs 0 min) que mantuvo hasta pasada 1h ([Figura 34D](#)). Estos resultados nos indican que el tratamiento con LTB<sub>4</sub> es capaz de inducir la fosforilación de ERK, p38, JNK1/2 y AKT en monocitos U-937.





**FIGURA 34. LTB4 activa ERK1/2, p38, JNK y la PI3K/AKT en monocitos humanos.** Los monocitos fueron tratados con LTB4  $10^{-7}$  mol/L durante distintos tiempos. La figura muestra en la parte superior de cada panel la cuantificación con los niveles proteicos medios  $\pm$  EEM de 4-5 experimentos diferentes. En la parte inferior de cada panel se muestran fotografías representativas de Western-blot de ERK1/2 (A), p38 (B), JNK1/2 (C) y AKT (D). #  $p < 0.05$  vs 0; †  $p < 0.005$  vs 0 y &  $p < 0.001$  vs 0.

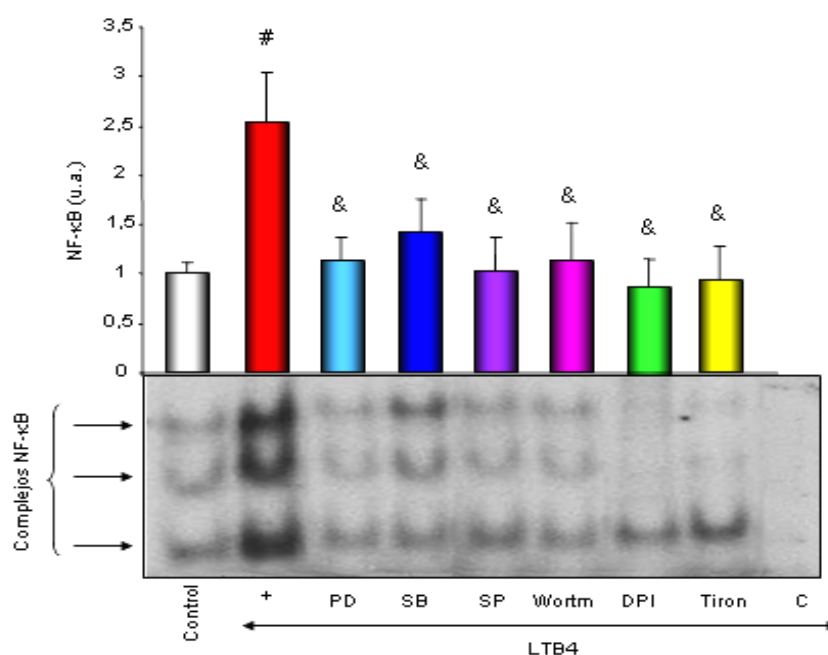
Demostrado que LTB4 es capaz de activar estas rutas de señalización intracelular, nuestro siguiente objetivo fue averiguar que receptor y/o receptores estaban implicados en dichas activaciones. Pretratamos los monocitos durante 1h con los antagonistas de los receptores, U-75302 y LY-255283 y posteriormente los incubamos con LTB4 ( $10^{-7}$  mol/L) a los tiempos que se producía la mayor activación para cada una de las quinasas estudiadas. Como se puede observar en la figura 35, el pretratamiento durante 1h con el antagonista del BLT1, U-75302 ( $10^{-7}$  mol/L) o con el antagonista del receptor BLT2, Ly-255283 ( $10^{-7}$  mol/L) disminuyó significativamente la activación de las quinasas ERK1/2 ( $p < 0.005$  vs LTB4), JNK1/2 ( $p < 0.005$  vs LTB4) y la PI3K/AKT ( $p < 0.005$  vs LTB4) en monocitos tratados con LTB4. En cambio, no observamos ningún efecto en la modulación de la activación de la MAPK p38 cuando preincubamos los monocitos con los antagonistas BLT1 o BLT2 ( $p = ns$  vs LTB4). Por lo que podemos concluir que LTB4 vía BLT1 y BLT2 es capaz de activar las rutas de señalización de las MAPK, ERK1/2 y JNK1/2 y de la PI3K/AKT en monocitos U-937.



**FIGURA 35. LTB4 vía BLT1 y BLT2 activa ERK1/2, JNK1/2 y la PI3K/AKT en monocitos.** Tratamos los monocitos durante 1h con U-75302 (U;  $10^{-7}$  mol/L) y con Ly-255283 (Ly;  $10^{-7}$  mol/L) antagonistas de BLT1 y BLT2 respectivamente, y posteriormente los incubamos con LTB4,  $10^{-7}$  mol/L. La figura muestra en la parte inferior los geles representativos y en la parte superior los datos expresados como media $\pm$ EEM de 3 experimentos de Western blot para ERK1/2 (**A**), JNK1/2 (**B**), AKT (**C**) y p38 (**D**). # $p < 0.005$  vs control; & $p < 0.005$  vs LTB4

Con el fin de obtener más información sobre la señalización inducida por LTB4, incubamos los monocitos con distintos inhibidores de las rutas de las quinasas y estudiamos que efecto tenía dicha inhibición en la activación de NF- $\kappa$ B en monocitos humanos tratados con LTB4. Pretratamos las células durante 45min con PD-98059, inhibidor de ERK1/2, SB-203580, inhibidor de p38, SP-600125, inhibidor de JNK y Wortmanina, inhibidor de PI3K/AKT, y posteriormente las tratamos con LTB4  $10^{-7}$  mol/L durante 90 min. En la Figura 36 podemos observar que el tratamiento con los inhibidores de ERK1/2 ( $p < 0.005$  vs LTB4), p38 ( $p < 0.005$  vs LTB4), JNK ( $p < 0.005$  vs LTB4) y PI3K/AKT ( $p < 0.005$  vs LTB4), disminuyó la activación de NF- $\kappa$ B inducida por LTB4 en monocitos. El incremento en la concentración de  $Ca^{2+}$  intracelular producido por la unión de LTB4 a sus receptores

activa diferentes rutas de señalización implicadas en la formación de radicales de  $O_2^-$ , que dañan las células y producen inflamación. En este sentido nos planteamos si en la activación de NF- $\kappa$ B a través de LTB4 podrían participar también especies reactivas de oxígeno, por lo que tratamos a las células con scavengers o capturadores de  $O_2^-$ , tiron y DPI, comprobando que se disminuía la actividad de unión de NF- $\kappa$ B al DNA con el tratamiento con ambos antioxidantes. Estos datos nos indican que la activación de NF- $\kappa$ B inducida por LTB4 monocitos, participan las rutas de señalización de ERK1/2, p38, JNK, PI3K/AKT y las rutas implicadas en la producción de estrés oxidativo.



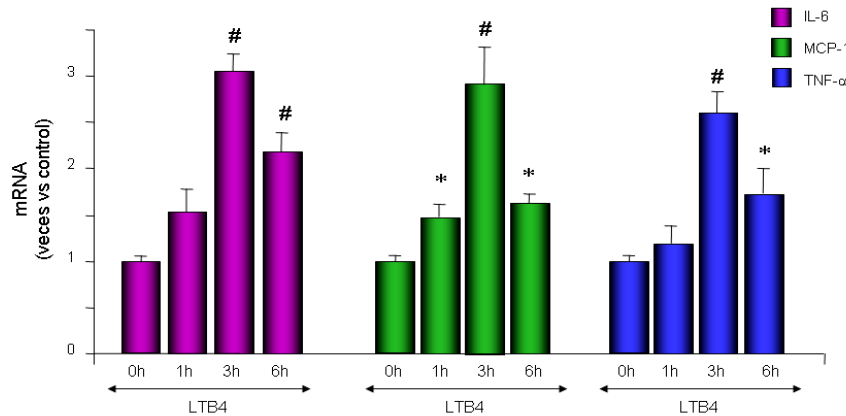
**FIGURA 36. LTB4 activa NF- $\kappa$ B a través de las rutas de las MAPK, PI3K y estrés oxidativo.** Los monocitos fueron preincubados durante 45min con inhibidores de ERK1/2, PD-98059 (PD) a  $10^{-5}$  mol/L, con el inhibidor de p38, SB-203580 (SB) a  $10^{-6}$  mol/L, con el inhibidor de JNK1/2 SP-600125 (SP) a  $10^{-5}$  mol/L, con el inhibidor de PI3K/AKT, Wortmanina (Wortm) a  $10^{-5}$  mol/L y los antioxidantes DPI y Tiron a dosis de  $10^{-5}$  mol/L cada uno. Posteriormente los tratamos con LTB4 durante 90min a una dosis de  $10^{-7}$  mol/L. La figura muestra los valores de la media  $\pm$  EEM de 4-5 experimentos y una fotografía representativa de EMSA. #  $p < 0.001$  vs control; y &  $p < 0.005$  vs LTB4. Los ensayos de competición (C) están hechos con 100 veces un exceso de NF- $\kappa$ B sin marcar

### 3.- LTB4 induce la expresión de genes proinflamatorios en monocitos

Para seguir explorando el papel del LTB4 en la inflamación, y en sus rutas de señalización, nos propusimos investigar si dicho metabolito era capaz de regular factores proinflamatorios bajo el control de NF- $\kappa$ B. Elegimos los genes de las principales citoquinas proinflamatorias que participan en la patogénesis y desarrollo de la aterosclerosis, como son la IL-6, el TNF- $\alpha$  y el MCP-1. Incubamos los monocitos con LTB4 ( $10^{-7}$  mol/L) durante diferentes tiempos, y mediante la técnica de PCR a



tiempo real, analizamos la expresión génica de las citoquinas y quimioquinas antes mencionadas. En la Figura 37 podemos ver que LTB<sub>4</sub> es capaz de regular al alza la expresión génica de IL-6, MCP-1 y TNF- $\alpha$  de manera dependiente del tiempo en monocitos humanos, consiguiendo un máximo a las 3 horas de incubación.



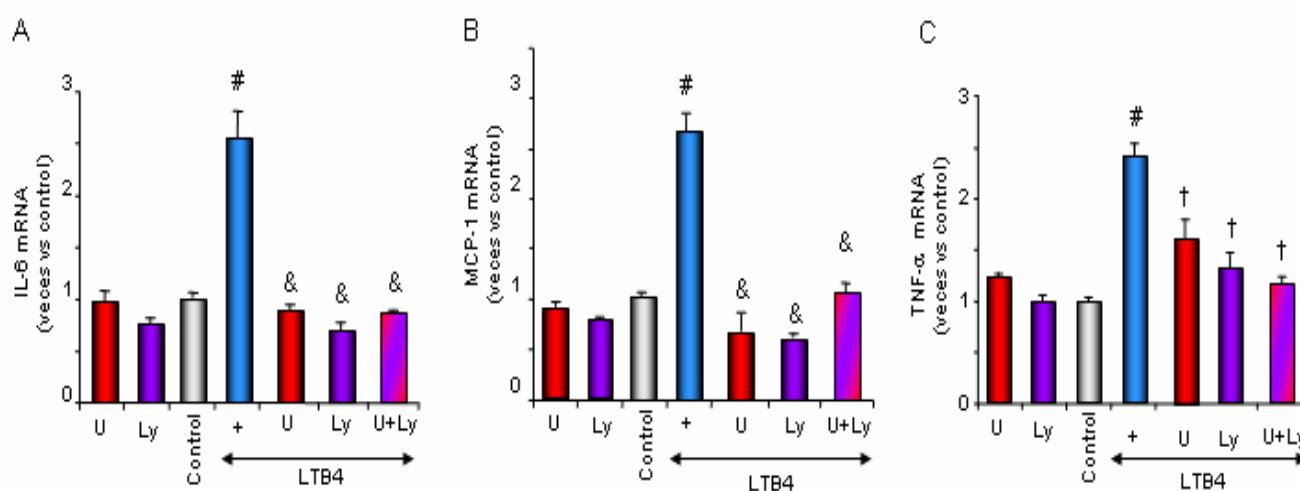
**FIGURA 37. LTB<sub>4</sub> incrementa la expresión génica de IL-6, MCP-1 y TNF- $\alpha$  en monocitos U-937.** Incubamos las células con LTB<sub>4</sub> ( $10^{-7}$  mol/L) durante diferentes tiempos y posteriormente analizamos la expresión génica de, IL-6, MCP-1 y TNF- $\alpha$  por PCR a tiempo real. Los resultados están expresados como la media  $\pm$  EEM de 4 experimentos. \* $p < 0.05$  vs 0h; # $p < 0.005$  vs 0h.

### 3.1.- LTB<sub>4</sub> modula la expresión génica de IL-6, MCP-1 y TNF- $\alpha$ vía BLT1 y BLT2 en monocitos humanos

Como hemos mencionado anteriormente, BLT1 y BLT2 están implicados en el incremento de la actividad de NF- $\kappa$ B. Así, decidimos estudiar si el incremento en la expresión génica de las citoquinas IL-6, MCP-1 y TNF- $\alpha$ , también se producía por ambos receptores o era específico de uno u otro.

Preincubamos los monocitos durante 1h con los antagonistas de los receptores BLT1 y BLT2, U-75302 y Ly-255283 respectivamente, y después los tratamos con LTB<sub>4</sub>  $10^{-7}$  mol/L durante 3h. Mediante análisis con PCR a tiempo real encontramos que el tratamiento tanto con el antagonista BLT1 como con el antagonista BLT2, consiguió inhibir la expresión génica de las citoquinas estudiadas de manera dosis dependiente (no mostrado). En el caso de los genes de IL-6 (Figura 38A) y MCP-1 (Figura 38B) el tratamiento con U-75302 y Ly-255283 a dosis de  $10^{-7}$  mol/L, normalizó la expresión de ambos genes ( $p < 0.005$  vs control). En el caso del gen de TNF- $\alpha$  (Figura 38C) ambos antagonistas consiguieron también inhibir el incremento en la expresión génica inducido por LTB<sub>4</sub>, aunque dicha inhibición fue menor que en el caso de las citoquinas antes mencionadas ( $p < 0.05$  vs LTB<sub>4</sub>). No encontramos efecto aditivo en la regulación génica de IL-6, MCP-1 y TNF- $\alpha$  cuando

pretratamos a los monocitos con ambos antagonistas (Figura 38). Quisimos asegurarnos de que el efecto del tratamiento con los antagonistas por sí solos no producía modulación génica de las citoquinas estudiadas, comprobando que ninguno de ellos consiguió activar la expresión génica de IL-6, MCP-1 y TNF- $\alpha$  (Figura 38).



**FIGURA 38. LTB4 modula la expresión génica de IL-6, MCP-1 y TNF- $\alpha$  vía BLT1 y BLT2 en monocitos.** Pretratamos las células durante 1h con U-75302 y LY-255283 a una dosis de  $10^{-7}$  mol/L y posteriormente los incubamos con LTB4 ( $10^{-7}$  mol/L) durante 3h. La figura muestra la expresión génica de IL-6 (A), MCP-1 (B) y TNF- $\alpha$  (C) por PCR a tiempo real. Los resultados están expresados como la media  $\pm$  EEM de 4 experimentos. # $p < 0.001$  vs Control; †  $p < 0.05$  vs LTB4 y &  $p < 0.005$  vs LTB4.

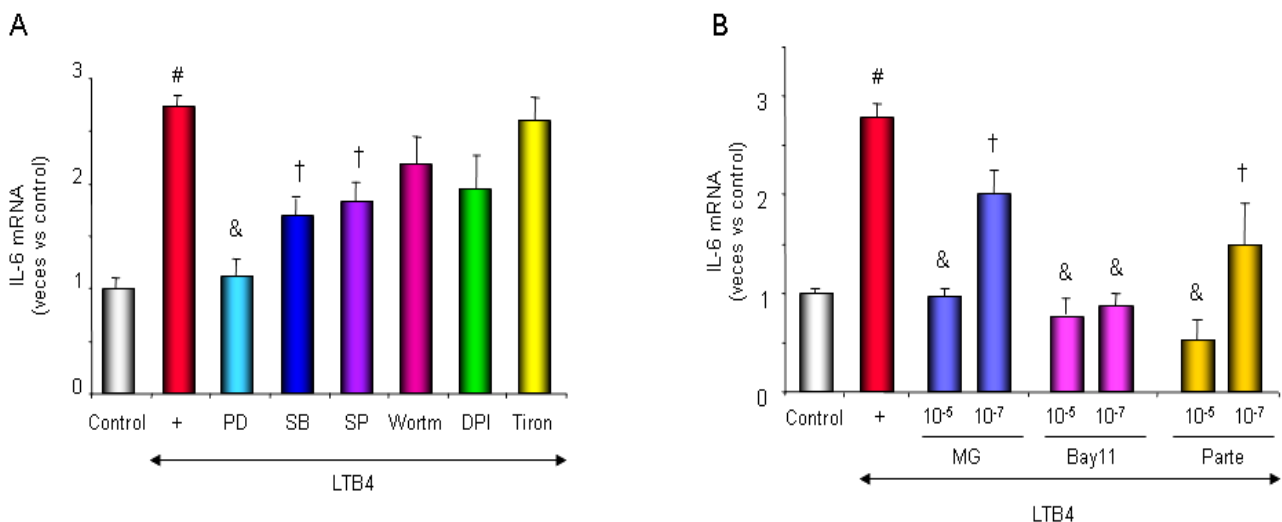
### 3.2- La inhibición de las rutas de MAPK y de NF- $\kappa$ B modula la expresión génica inducida por LTB4 en monocitos humanos.

Como hemos demostrado anteriormente, la unión de LTB4 a sus receptores de membrana, BLT1 y BLT2 induce una cascada de señalización intracelular en la que participan las MAPKs y el factor nuclear NF- $\kappa$ B. Además hemos demostrado que LTB4 es capaz de inducir el incremento de la expresión de IL-6, MCP-1 y TNF- $\alpha$  vía BLT1 y BLT2 en monocitos. Con estos antecedentes nos planteamos si el bloqueo en las rutas de señalización de las MAPKs y de NF- $\kappa$ B, podría modular también la expresión de las citoquinas IL-6, MCP-1 y TNF- $\alpha$  en monocitos U-937 tratados con LTB4.

Para el bloqueo de la ruta de las MAPK utilizamos diferentes inhibidores: PD-98059, inhibidor de ERK1/2, SB-203580, inhibidor de p38, SP-600125, inhibidor de JNK y Wortmanina, inhibidor de PI3K/AKT. Para el bloqueo de NF- $\kappa$ B utilizamos: MG-132, inhibidor específico del proteasoma, Bay117082, inhibidor de la fosforilación de la subunidad I $\kappa$ B $\alpha$  y partenolide, inhibidor de la ruta de

señalización IKK/NF- $\kappa$ B. Todos los inhibidores se pusieron en el medio 45min previo a la estimulación con LTB4  $10^{-7}$  mol/L durante 3h.

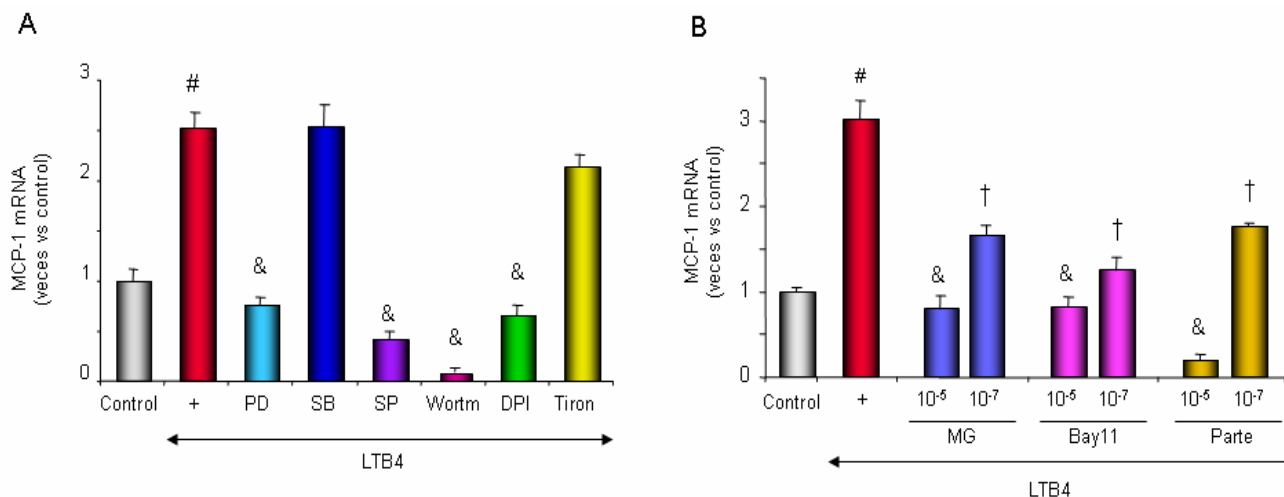
Los resultados obtenidos nos indican que para el caso del gen de la IL-6 (Figura 39A) el tratamiento con los inhibidores de p38 y JNK, SB-203580 y SP-600125 respectivamente, consiguieron disminuir significativamente el incremento en la expresión de IL-6 inducido por LTB4 ( $p < 0.05$  vs control), mientras que el inhibidor de ERK, PD-98059, consiguió incluso normalizar el incremento producido por LTB4 ( $p < 0.005$  vs control). En cambio, no modificó la expresión génica de IL-6 el inhibidor de PI3K/AKT, wortmanina, ni el tratamiento con antioxidantes como el DPI y el Tiron. El tratamiento con los inhibidores de NF- $\kappa$ B a la dosis más alta empleada, llegó a normalizar en todos los casos el incremento en la expresión de IL-6 inducido por LTB4 ( $p < 0.005$  vs control) en monocitos humanos (Figura 39B).



**FIGURA 39. La inhibición de las rutas de ERK1/2, p38 y PI3K/AKT y de NF- $\kappa$ B es capaz de modular la expresión génica de IL-6 inducida por LTB4 en monocitos humanos. (A)** Incubamos los monocitos U-937 durante 45 min con diferentes inhibidores de la ruta de las MAPKs, PI3K/AKT y antioxidantes y posteriormente los tratamos con LTB4 durante 3h. Los inhibidores son: PD-98059 (PD) a  $10^{-5}$  mol/L, inhibidor de ERK1/2; SB-203580 (SB) a  $10^{-6}$  mol/L, inhibidor de p38, SP-600125 (SP) a  $10^{-5}$  mol/L inhibidor de JNK1/2, Wortmanina (Wortm) a  $10^{-5}$  mol/L, inhibidor de PI3K/AKT, y los antioxidantes DPI y Tiron a dosis de  $10^{-5}$  mol/L cada uno. Mediante PCR a tiempo real analizamos la expresión génica de IL-6. **(B)** Incubamos los monocitos con diferentes inhibidores de NF- $\kappa$ B, MG-132 (MG), Bay-117032 (Bay) y Partenolide (Parte), posteriormente los tratamos con LTB4. La figura muestra la expresión génica de IL-6 analizada mediante Real Time PCR. Los resultados están expresados como la media de 4 experimentos. #  $p < 0.001$  vs control; †  $p < 0.05$  vs LTB4 y &  $p < 0.001$  vs LTB4.

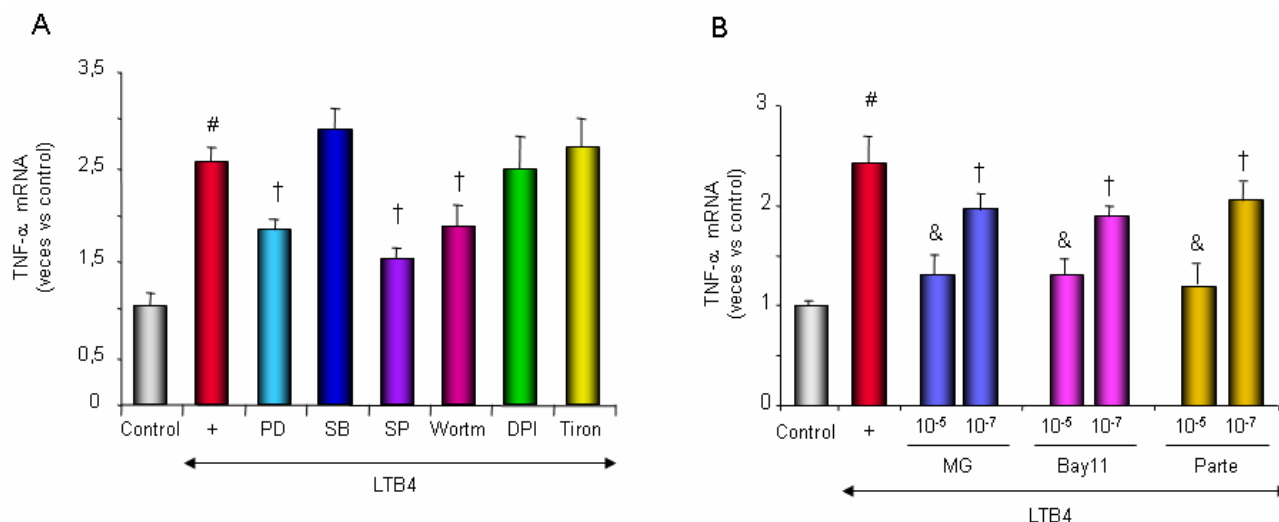
En el caso de MCP-1, encontramos que ni el tratamiento con el inhibidor de p38, ni con el antioxidante Tiron, consiguieron modular el incremento producido por LTB4. En cambio, cuando se trataron las células con los inhibidores de ERK, JNK, PI3K/AKT y con el antioxidante DPI, se produjo una inhibición hasta niveles basales en la expresión de MCP-1 inducida por LTB4 ( $p < 0.005$  vs control en todos los casos) (Figura 40A). El tratamiento con los inhibidores de NF- $\kappa$ B a la dosis más alta

empleada, llegó a normalizar en todos los casos, el incremento en la expresión de MCP-1 inducido por LTB<sub>4</sub> ( $p < 0.005$  vs control) en monocitos humanos (Figura 40B).



**FIGURA 40. La inhibición de las rutas de ERK1/2, JNK1/2, PI3K/AKT y de NF-κB es capaz de modular la expresión génica de MCP-1 inducida por LTB<sub>4</sub> en monocitos humanos. (A)** Incubamos los monocitos U-937 durante 45 min con diferentes inhibidores de la ruta de las MAPKs, PD-98059 (PD) a 10<sup>-5</sup> mol/L (inhibidor de ERK1/2), SB-203580 (SB) a 10<sup>-6</sup> mol/L (inhibidor de p38), SP-600125 (SP) a 10<sup>-5</sup> mol/L (inhibidor de JNK1/2), Wortmanina (Wortm) a 10<sup>-5</sup> mol/L (inhibidor de PI3K/AKT) y los antioxidantes DPI y Tiron a dosis de 10<sup>-5</sup> mol/L cada uno, y posteriormente los tratamos con LTB<sub>4</sub>. Mediante PCR a tiempo real analizamos la expresión de MCP-1. **(B)** Incubamos los monocitos con diferentes inhibidores de NF-κB, MG-132 (MG), Bay-117032 (Bay) y Partenolide (Parte). La figura muestra la expresión génica de MCP-1 analizada mediante Real Time PCR. Los resultados están expresados como la media de 4 experimentos. #  $p < 0.001$  vs control; †  $p < 0.05$  vs LTB<sub>4</sub> y &  $p < 0.001$  vs LTB<sub>4</sub>.

Cuando nos fijamos en la expresión génica de TNF- $\alpha$ , comprobamos que su modulación se produce a través de la inhibición de ERK, JNK y PI3K/AKT ( $p < 0.05$  vs control) (Figura 41A). Observamos que no se produjo modulación en la expresión génica de TNF- $\alpha$  cuando se inhibió la ruta de p38, por lo que dicha vía no se encuentra implicada en el incremento génico de TNF- $\alpha$ . En este mismo sentido el tratamiento con los antioxidantes, DPI y Tirón, tampoco tuvo ningún efecto en la modulación génica de TNF- $\alpha$ . En cambio, la inhibición de la ruta de NF-κB a distintos niveles, produjo una disminución dosis-dependiente en la expresión génica de TNF- $\alpha$  con todos los inhibidores utilizados ( $p < 0.005$  vs control) (Figura 41B).



**FIGURA 41. La inhibición de ERK1/2, JNK1/2 PI3K/AKT y de NF-κB es capaz de modular la expresión génica de TNF-α inducida por LTB4 en monocitos humanos. (A)** Incubamos los monocitos U-937 durante 45 min con diferentes inhibidores de rutas intracelulares de señalización. PD-98059 (PD) a 10<sup>-5</sup> mol/L (inhibidor de ERK1/2), SB-203580 (SB) a 10<sup>-6</sup> mol/L (inhibidor de p38), SP-600125 (SP) a 10<sup>-5</sup> mol/L (inhibidor de JNK), Wortmanina (Wortm) a 10<sup>-5</sup> mol/L (inhibidor de PI3K/AKT) y los antioxidantes DPI y Tiron a dosis de 10<sup>-5</sup> mol/L cada uno, y posteriormente los tratamos con LTB4. Mediante PCR a tiempo real analizamos la expresión de TNF-α. **(B)** Incubamos los monocitos con diferentes inhibidores de NF-κB, MG-132 (MG), Bay-117032 (Bay) y Partenolide (Parte). La figura muestra la expresión génica de TNF-α analizada mediante Real Time PCR. Los resultados están expresados como la media de 4 experimentos. Los resultados están expresados como la media de 4 experimentos. # p<0.001 vs control; † p<0.05 vs LTB4 y & p<0.001 vs LTB4.

Este grupo de resultados nos sugiere que en la línea monocítica humana U-937, el metabolito LTB4 a través de sus receptores BLT1 y BLT2 incrementa la fosforilación de la subunidad inhibitoria IκBα, lo que conduce al aumento en la translocación nuclear del dímero p50/p65 del factor nuclear NF-κB y esto se traduce en el incremento en la actividad de unión de dicho factor al DNA y, como consecuencia, en el incremento en la transcripción de genes proinflamatorios como las citoquinas IL-6, MCP-1 y TNF-α. Por otro lado, el bloqueo tanto de la ruta de las MAPKs como del factor nuclear NF-κB, es capaz de inhibir el incremento en la transcripción génica de IL-6, MCP-1 y TNF-α, inducido por LTB4.

Con todo el grupo de resultados mostrado hasta ahora en células monocíticas humanas U-937, hemos desgranado el mecanismo a través del cual LTB4 vía BLT1 y BLT2 es capaz de incrementar el estado inflamatorio. Estos hallazgos corroboran los obtenidos en los pacientes con aterosclerosis carotídea, que presentan altos niveles en la expresión de los receptores BLT1 y BLT2 en las PBMCs en relación a sujetos control, y mayor expresión de BLT1 en la zona inflamatoria de la placa aterosclerótica. Por otro lado, también a nivel de placa aterosclerótica, encontramos que ambos receptores están expresados a la par que el NF-κB activo, relacionándose estos datos con los

observados *in vitro*, donde el LTB<sub>4</sub> es capaz de modular la activación de NF- $\kappa$ B y genes relacionados, via BLT1 y BLT2.

#### 4.- La inhibición de la ruta 5-LO/LTA<sub>4</sub>H modula la activación de la ruta de las MAPKs y de NF- $\kappa$ B inducida por LTB<sub>4</sub> en monocitos humanos

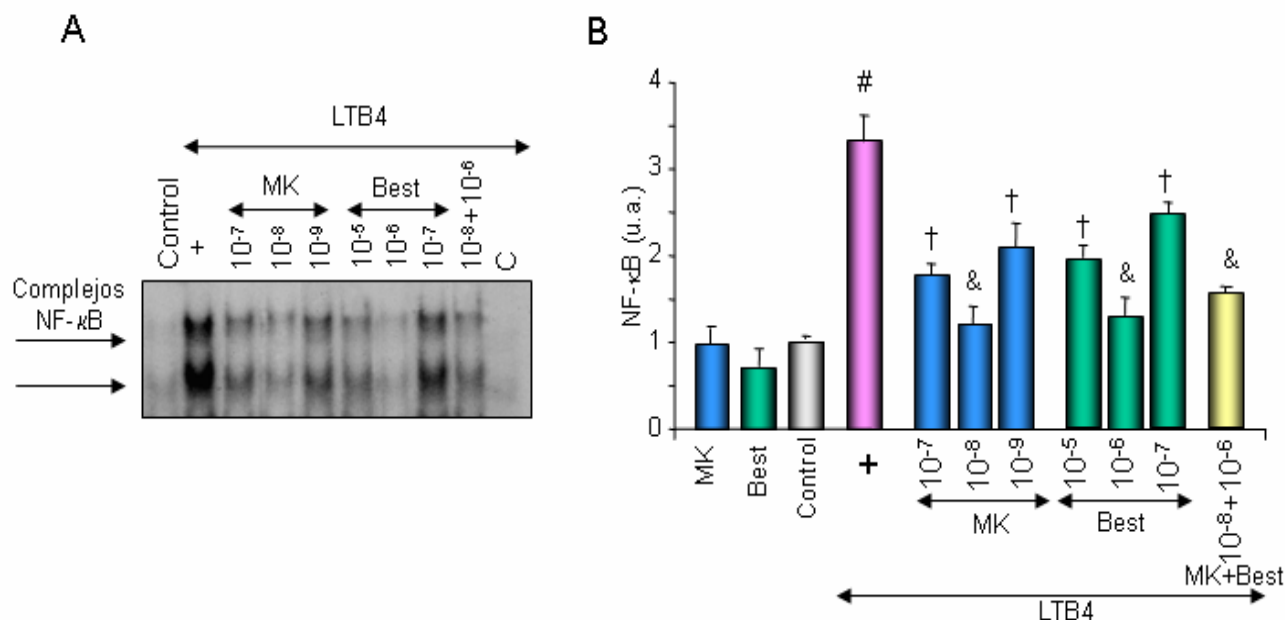
La regulación de la principal enzima que da lugar a los leucotrienos, la 5-LO, ocurre por diferentes mecanismos debido a su estructura. En su dominio catiónico C-terminal contiene hierro, necesario para la activación de la misma, por otro lado, el dominio N-terminal tiene forma de  $\beta$ -sandwich con los típicos bucles y es capaz de unirse al Ca<sup>2+</sup>, favoreciendo la activación de la propia enzima y su anclaje a la membrana.

Aparte de estos mecanismos de regulación, la 5-LO posee en su molécula tres sitios diferentes de fosforilación que también participan en su regulación enzimática. Un sitio para MAPKAPK2/3 (quinasa activada por p38), otro para ERK1/2 y otro para PKA, participando los dos primeros en la activación de la 5-LO y el último en su inactivación<sup>139,149,150</sup>. Dado que hemos demostrado que LTB<sub>4</sub> es capaz de inducir la activación de ERK y de p38, quinastas que participan en la activación de la enzima 5-LO, nos planteamos si el tratamiento de los monocitos con LTB<sub>4</sub> sería capaz de activar la ruta de 5-LO/LTA<sub>4</sub>H produciendo un mecanismo de retroalimentación positiva.

En un trabajo publicado por nuestro grupo, hemos demostrado que la inhibición de la enzima 5-LO en monocitos THP-1, utilizando MK-886 (inhibidor de FLAP), disminuye la activación del factor nuclear NF- $\kappa$ B inducida por citoquinas inflamatorias<sup>194</sup>. Datos presentes en la bibliografía también demuestran que otros estímulos proinflamatorios como puede ser LPS, incrementan la activación de NF- $\kappa$ B en un mecanismo dependiente de la activación de la enzima 5-LO<sup>169</sup>. En otros tipos celulares como keratinocitos estimulados con citoquinas inflamatorias también se describe un mecanismo de activación de NF- $\kappa$ B dependiente de la activación de la enzima 5-LO<sup>10</sup>. En este sentido, no existen datos que indiquen la activación de dicho factor nuclear a través de LTB<sub>4</sub> y de la ruta 5-LO/LTB<sub>4</sub>.

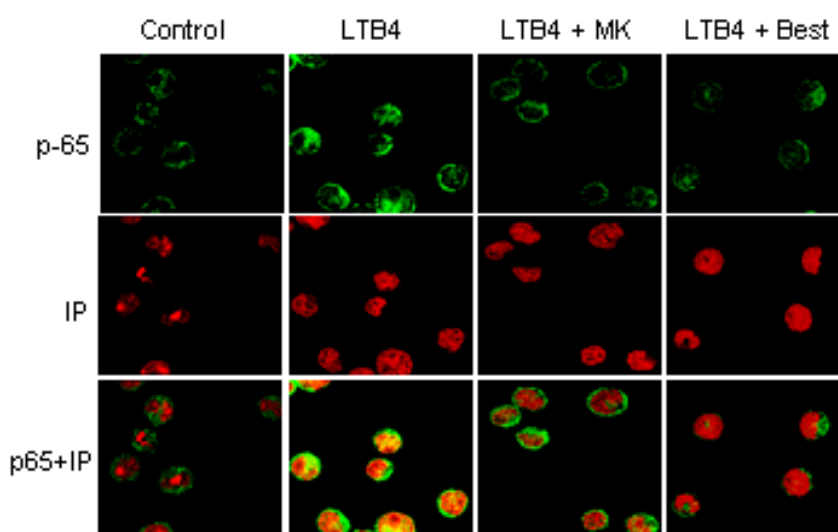
Incubamos los monocitos con inhibidores específicos de FLAP y de LTA<sub>4</sub>H, el MK-886 y la Bestatina respectivamente, y posteriormente los estimulamos con LTB<sub>4</sub> durante 90min. Mediante ensayos de EMSA, como se muestra en la [Figura 43](#), observamos que tanto la inhibición de 5-LO, como de LTA<sub>4</sub>H, disminuyen la activación de NF- $\kappa$ B inducida por LTB<sub>4</sub>. La mayor inhibición se obtuvo con la dosis de MK-886 a 10<sup>-8</sup> mol/L (p<0.005 vs LTB<sub>4</sub>) y LTA<sub>4</sub>H a 10<sup>-6</sup> mol/L (p<0.005 vs LTB<sub>4</sub>). Quisimos averiguar si el tratamiento conjunto con ambos inhibidores ejercía efecto aditivo en la inhibición de NF- $\kappa$ B, pero los resultados nos muestran que no se produce tal efecto, aunque la inhibición fue significativa y similar a la obtenida con los inhibidores por separado (p<0.005 vs LTB<sub>4</sub>).

Para corroborar que el MK-886 y la Bestatina no tenían efecto por sí solos en la activación de NF- $\kappa$ B, tratamos los monocitos con los inhibidores sólo sin estímulo y observamos que no se produjo ningún efecto en la activación de NF- $\kappa$ B, por lo que podemos concluir que no funcionan como agonistas y/o antagonistas.



**FIGURA 43. La inhibición de la ruta 5-LO/LTA4H modula la actividad de NF- $\kappa$ B en monocitos humanos tratados con LTB4.** Pretratamos los monocitos durante 1 hora con distintas dosis de MK-886 (MK) y Bestatina (Best) y posteriormente las estimulamos con LTB4 ( $10^{-7}$  mol/L) durante 90min. **(A)** La figura muestra un gel de EMSA representativo. Los ensayos de competición (C) están hechos con 100 veces un exceso de NF- $\kappa$ B sin marcar. **(B)** La gráfica representa los valores de la media  $\pm$  EEM de 4-5 experimentos diferentes. #  $p < 0.001$  vs control; †  $p < 0.05$  vs LTB4 y  $p < 0.005$  vs LTB4.

Anteriormente hemos demostrado mediante ensayos de super-retardo que la activación de NF- $\kappa$ B implica la formación y activación del complejo p50/p65. También hemos observado que la inhibición de BLT1 y BLT2 disminuye la translocación nuclear de la subunidad p65 inducida por LTB4. En este sentido, nos planteamos si la inhibición de las enzimas 5-LO y LTA4H también disminuirían la translocación de dicha subunidad al interior nuclear cuando tratábamos los monocitos con LTB4. Como podemos apreciar en la [Figura 44](#), el pretratamiento con MK-886 ( $10^{-8}$  mol/L) y con Bestatina ( $10^{-6}$  mol/L) produce una disminución en la translocación nuclear de la subunidad p65 del NF- $\kappa$ B con respecto a la observada en las células tratadas con LTB4. Con estos resultados podemos concluir que la inhibición de la ruta 5-LO/LTA4H, modula la activación de NF- $\kappa$ B inducida por LTB4 en células monocíticas humanas.



**FIGURA 44. El tratamiento con MK-886 y Bestatina inhibe la translocación nuclear de la subunidad p65 del NF- $\kappa$ B en monocitos.** Los monocitos fueron preincubados durante 1h con MK-886 ( $10^{-8}$ mol/L; MK) y con bestatina ( $10^{-6}$ mol/L, Best) inhibidores de FLAP y LTA4H respectivamente, y posteriormente tratados con LTB4 ( $10^{-7}$ mol/L) durante 90min. En la figura se muestra una fotografía representativa de microscopía confocal en la que se muestra una inmunofluorescencia con el anticuerpo frente a la subunidad p65 de NF- $\kappa$ B (tinción verde). La integridad del núcleo se observó mediante la tinción con yoduro de (IP, tinción roja).

## 5.- La inhibición de la ruta 5-LO/LTA4H modula la activación génica de IL-6, MCP-1 y TNF- $\alpha$ inducida por LTB4 en monocitos humanos

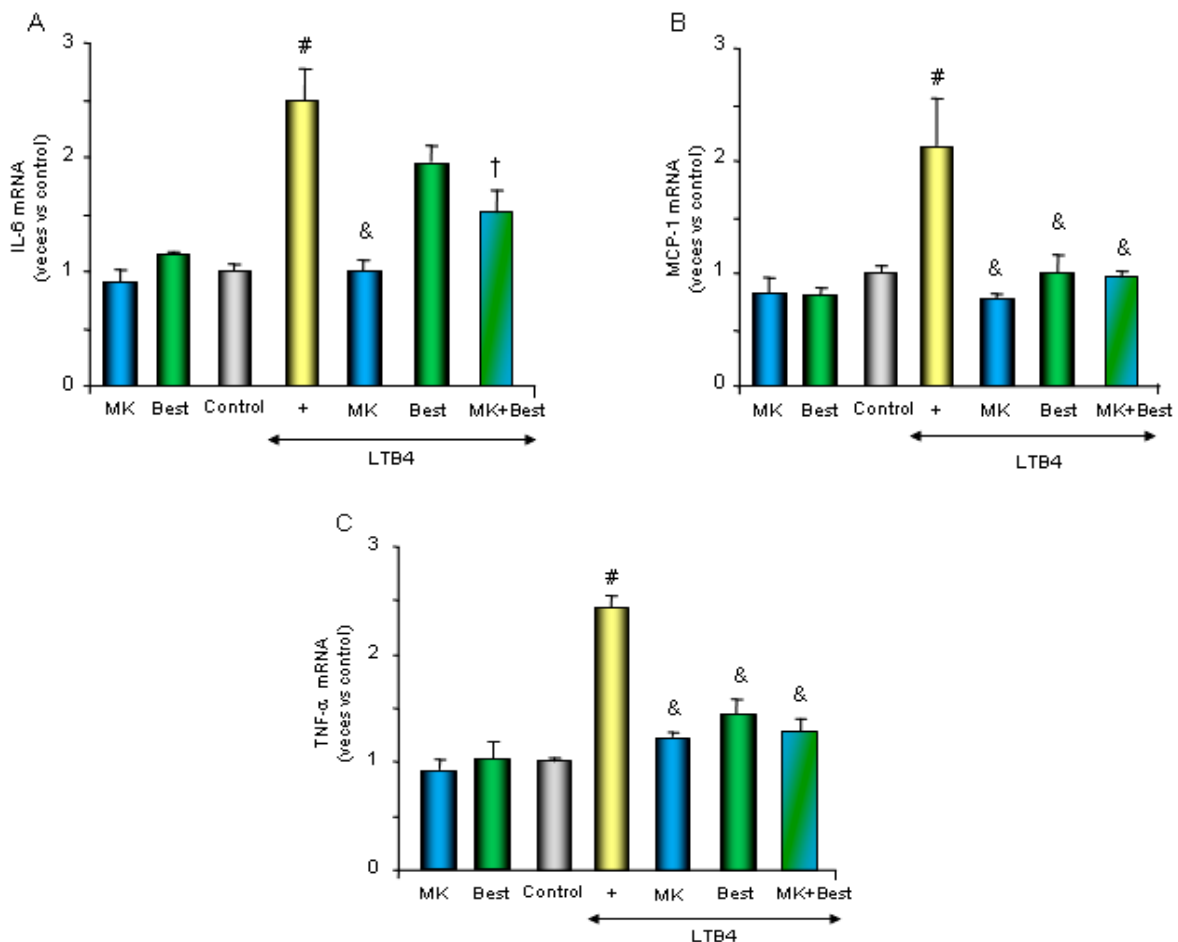
En los resultados previos hemos demostrado que LTB4 vía BLT1 y BLT2 activa NF- $\kappa$ B y este a su vez induce la transcripción de los genes de las principales citoquinas proinflamatorias implicadas en aterosclerosis, IL-6, MCP-1 y TNF- $\alpha$ . También hemos mostrado que la inhibición de la ruta 5-LO/LTA4H, inhibe tanto la translocación de la subunidad p65 como la actividad de NF- $\kappa$ B. El siguiente objetivo planteado fue demostrar si dicha inhibición podría modular la expresión génica de las citoquinas proinflamatorias IL-6, MCP-1 y TNF- $\alpha$  en células monocíticas humanas estimuladas con LTB4.

Pretratamos las células durante 1h con los inhibidores de FLAP, MK-886 y de LTA4H, Bestatina, para posteriormente incubarlos con LTB4 durante 3h (tiempo de mayor expresión de todas las citoquinas, [Figura 32](#)). Mediante PCR a tiempo real, observamos que la expresión génica de IL-6 fue disminuida llegando a obtener valores iguales a las células control cuando se incubaron los monocitos con MK-886 ( $p < 0.005$  vs LTB4), pero la inhibición con Bestatina no consiguió llegar a valores significativos ([Figura 45 A](#)). En el caso de MCP-1 y TNF- $\alpha$ , ambos inhibidores consiguieron



modular el incremento en la expresión de los mismos después del tratamiento con LTB4 (Figura 45B y C) llegando en algún caso incluso a normalizar la expresión de dichas citoquinas ( $p < 0.005$  vs LTB4 para MCP-1 y TNF- $\alpha$ ).

Estudiando si se produciría un efecto aditivo en la modulación génica de IL-6, MCP-1 y TNF- $\alpha$ , cuando se incubaban los monocitos con MK-886 y Bestatina, conjuntamente, observamos que no se consigue dicho efecto aditivo siendo el grado de inhibición similar al obtenido con los inhibidores por separado ( $p < 0.05$  vs LTB4 para IL-6 y  $p < 0.005$  vs LTB4 para MCP-1 y TNF- $\alpha$ ) (Figura 45A, B y C). Para demostrar que los inhibidores utilizados no tenían efecto *per sé* en la modulación génica de las citoquinas estudiadas, incubamos las células en presencia de ellos sólo no produciéndose ningún efecto en la modulación de la expresión génica de las citoquinas estudiadas, por lo que podemos decir que no funcionan como agonistas.



**FIGURA 45. LA inhibición de la ruta 5-LO/LTA4H modula la activación génica de IL-6, MCP-1 y TNF- $\alpha$  inducida por LTB4 en monocitos.** Pretratamos las células durante 1h con MK-886 (MK) a dosis de  $10^{-8}$  mol/L y Bestatina (Best) a  $10^{-6}$  mol/L y posteriormente los incubamos con LTB4 ( $10^{-7}$  mol/L) durante 3h. La figura muestra la expresión génica de IL-6 (A), MCP-1 (B) y TNF- $\alpha$  (C) por PCR a tiempo real. Los resultados están expresados como la media  $\pm$  EEM de 4 experimentos. # $p < 0.001$  vs Control; †  $p < 0.05$  vs LTB4 y &  $p < 0.005$  vs LTB4.

Este grupo de resultados nos muestra que en la línea monocítica humana U-937, el LTB<sub>4</sub> está produciendo un fenómeno de retroalimentación positiva, ya que la unión del mismo a sus receptores BLT1 y BLT2 induce una cascada de señales intracelulares capaces de activar diferentes quinasas, el factor nuclear NF- $\kappa$ B, y genes proinflamatorios dependientes de NF- $\kappa$ B, como son las citoquinas IL-6, MCP-1 y TNF- $\alpha$ . En toda esta cascada de señalización inducida por LTB<sub>4</sub>, hemos demostrado que también es capaz de activar las principales enzimas implicadas en su propia biosíntesis, la 5-LO y la LTA4H, lo que conlleva que se incremente la biosíntesis del propio LTB<sub>4</sub> por la propia célula, favoreciendo de nuevo que se activen todas las señales intracelulares que conducen al incremento en la respuesta inflamatoria dependiente de LTB<sub>4</sub> produciendo un fenómeno de inflamación crónica.

# Discusión

## 1.- CARACTERIZACIÓN DE MEDIADORES INFLAMATORIOS EN PACIENTES CON SCASEST

Los SCA se deben principalmente a la rotura y trombosis de la placa aterosclerótica. En estos procesos, la inflamación actúa como motor ejecutor de la maquinaria aterotrombótica. Las células inflamatorias secretan diferentes moléculas pro-inflamatorias y enzimas proteolíticas que degradan las proteínas de matriz y debilitan la cápsula fibrosa de las lesiones ateroscleróticas, haciéndolas más propensas a la rotura y a la posterior trombosis<sup>60,138</sup>. Existen diferentes factores de riesgo que favorecen el desarrollo de los SCA, como son la hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, tabaquismo, hipertensión, diabetes y predisposición genética. Todos ellos contribuyen a la alteración de la expresión y liberación de diferentes moléculas que modifican las funciones propias del endotelio y potencian la acumulación de células inflamatorias, que participan en los fenómenos de desestabilización, vulnerabilidad y rotura de las placas ateroscleróticas<sup>29,34,62,68,120</sup>. El término de “placa vulnerable”, muy utilizado en la actualidad, se refiere a aquel tipo de placas que morfológicamente presentan un gran infiltrado de células inflamatorias, y una delgada cápsula fibrosa. Hace más de una década se describió que las denominadas “placas vulnerables” acumulan mayor número de células inflamatorias que las no vulnerables<sup>110</sup>. Además, placas de pacientes que han sufrido SCA, presentan un mayor infiltrado de macrófagos que las procedentes de pacientes con enfermedad coronaria estable, acumulándose principalmente en la proximidad de las zonas de fisura<sup>138,192</sup>. Los fenómenos inflamatorios no se producen únicamente en las lesiones ateroscleróticas, sino también a nivel sistémico<sup>30,116</sup>. En este sentido, el 30% de los infartos se producen sin rotura de placa, por la formación de trombos sobre una placa con poco contenido graso y que estenosa mucho la luz del vaso<sup>66</sup>. En los últimos años, se ha puesto de relieve además que la predisposición de la sangre para la trombosis también es importante. Ha surgido así el término de “sangre vulnerable”, es decir, sangre especialmente propensa a desarrollar trombosis. En este sentido, se sabe que no toda trombosis de la placa conduce a un SCA, ya que el trombo formado no siempre es de tamaño suficiente para obstruir la luz vascular. En la severidad de la trombosis influyen no sólo las características de la placa, sino también la trombogenicidad de la sangre. Dado que varios tipos celulares presentes en las lesiones proceden de la sangre, y que ésta mantiene un intercambio bidireccional de moléculas con la pared vascular, sus anomalías pueden informarnos del estado de esta estructura. Desde la década de los 90 venimos asistiendo a la publicación de múltiples estudios que intentan buscar alguna proteína cuyos niveles o actividad puedan determinarse con un análisis de sangre y que fuera marcador del riesgo de eventos cardiovasculares. De entre todas las candidatas, destaca la PCR por la gran cantidad de estudios realizados con ella, pero a pesar de esto tiene limitaciones, y no todos los estudios encuentran que posea un gran valor pronóstico<sup>48</sup>. Los biomarcadores, junto con los factores de riesgo clásicos, podrían aportarnos información adicional sobre los pacientes y los posibles tratamientos que les beneficiarían.

En la práctica clínica actual, el riesgo de los pacientes que han sufrido un SCA se evalúa midiendo la liberación de unas moléculas llamadas Troponinas. Estas moléculas son marcadores de necrosis cardíaca, pero no están directamente implicadas en la patofisiología de los SCA. Por tanto, es esperable que su capacidad predictiva se vea superada por biomarcadores que estén involucrados en la patogenia de la aterotrombosis. En esta línea se han barajado diferentes biomarcadores sanguíneos, aparte de la PCR, como el CD40 Ligando (CD40L), asociado con mecanismos inflamatorios y trombóticos implicados en el SCA<sup>69</sup>, moléculas de adhesión, factor tisular, mieloperoxidasa MCP-1, IL-6, y algunas metaloproteinasas<sup>98</sup>. Sin embargo, ninguno de ellos ha demostrado ser útil en la práctica clínica.

Como hemos mencionado anteriormente, los monocitos circulantes son posiblemente las principales células implicadas en los fenómenos inflamatorios cardiovasculares. El estudio de estas células puede aportarnos información adicional sobre los procesos que subyacen en el desarrollo de dichas patologías. En 1981 se demostró que se encuentran activadas durante los SCA<sup>118</sup>. Nuestro laboratorio ha sido uno de los pioneros en el estudio de las PBMCs y su implicación en los procesos aterotrombóticos, aportando información adicional para el abordaje terapéutico de estas patologías. En esta tesis, uno de nuestros principales objetivos ha sido caracterizar diferentes mediadores sistémicos en sangre de pacientes con SCASEST, comparándolos con muestras de sujetos estables y sanos.

Como hemos mostrado a lo largo de esta tesis, el NF- $\kappa$ B es uno de los principales factores nucleares involucrados en la regulación de moléculas proinflamatorias y protrombóticas<sup>51</sup>. La actividad de dicho factor está incrementada en lesiones ateroscleróticas coronarias responsables de los SCA<sup>159</sup>, comparada con la de placas de pacientes estables<sup>203</sup>. En la zona más vulnerable de las placas, los hombros, hemos encontrado mayor activación de NF- $\kappa$ B que en la zona de la cápsula en placas de pacientes con estenosis carotídea<sup>127</sup>. Ritchie et al. demostraron que NF- $\kappa$ B se encuentra activo en pacientes con SCA, pudiendo estar implicado en la rotura de la placa y desencadenamiento de este evento<sup>159</sup>. En este sentido, nuestros datos muestran que los pacientes con SCASEST, presentan ya en el momento del ingreso, una activación significativa de NF- $\kappa$ B en sus PBMCs, respecto a la observada en los controles sanos y en los pacientes con enfermedad coronaria estable. Esta activación se mantuvo incrementada hasta los 2 meses, disminuyendo a los 6 meses. Nuestros datos están en consonancia con otros estudios realizados en células circulantes, donde también se señala que el NF- $\kappa$ B está activo en dichas células durante los SCA<sup>42,159</sup>, y que ese incremento tiene valor pronóstico en dicha patología<sup>117</sup>.

El aumento en la activación de NF- $\kappa$ B en las PBMCs de los pacientes con SCASEST, implica que probablemente la expresión de moléculas dependientes del mismo también se encuentren incrementadas. Así, la expresión de COX-2 y PGES, se encuentra incrementada durante los procesos inflamatorios, dando lugar a una sobreproducción de su producto proinflamatorio PGE2,

que actúa como mediador en la respuesta inmune e inflamatoria<sup>43,57,125,140,143</sup>. La PGE2 se asocia con la rotura de las placas ateroscleróticas, que es la responsable de los SCA. Trabajos realizados en nuestro laboratorio, así como datos publicados por otros grupos, han mostrado que la expresión de COX-2 y de PGES está aumentada en la zona de los hombros de las placas de pacientes con aterosclerosis carotídea<sup>75</sup> y en pacientes que han sufrido un reciente ictus ipsilateral, comparándolas con sujetos asintomáticos<sup>41</sup>. El incremento en la secreción de PGE2 por parte de las células inflamatorias se traduce en un aumento de la expresión y actividad de las MMPs, implicadas en los procesos de desestabilización y rotura de las placas<sup>41,75,76</sup>. Estudios recientes, han demostrado que la expresión de MMP-9 por macrófagos *in vitro* provoca la degradación de elastina, y que la sobreexpresión *in vivo*, de MMP-9 por macrófagos residentes en placas ateroscleróticas de ratones ApoE<sup>-/-</sup>, induce la rotura de las mismas<sup>78</sup>. Placas de pacientes con angina inestable presentan un incremento en la expresión y actividad catalítica de la MMP-9<sup>29</sup>, demostrándose también esta sobreexpresión en las zonas vulnerables de las placas de ateroma<sup>69</sup>. Nuestros datos muestran que los niveles circulantes de PGE2 y la actividad catalítica de la MMP-9 de pacientes con SCASEST, estaban aumentados en relación a los valores que presentaban los pacientes estables y los controles. Beloqui et al, han descrito la asociación existente entre el incremento de COX-2/PGE2 y el índice íntima-media de engrosamiento de la carótida en sujetos asintomáticos expuestos a factores de riesgo cardiovascular<sup>17</sup>. El índice íntima/media es un marcador independiente del riesgo de eventos cardiovasculares<sup>151</sup>. Nuestros datos muestran la existencia de una correlación positiva entre los niveles de PGE2 y la actividad catalítica de la MMP-9 en el plasma de los pacientes con SCASEST, reforzando la implicación de la PGE2 y la MMP-9 en la inestabilidad de la placa.

Otro de los mediadores inflamatorios estudiados es el LTB4, producto del metabolismo del ácido araquidónico, por acción de la enzima 5-LO. Este quimioattractante de leucocitos y neutrófilos induce quimiotaxis y proliferación de CMLV<sup>13</sup> e incrementa la expresión de MCP-1 en monocitos humanos<sup>88</sup>. En los últimos años, ha surgido un gran número de estudios implicando a los leucotrienos, principalmente el LTB4 y sus receptores, en el desarrollo y progresión de diferentes patologías coronarias. Se ha descrito que las placas de pacientes sintomáticos presentan un incremento en la expresión de la proteína 5-LO comparándola con sujetos asintomáticos<sup>40</sup>. Además, diferentes estudios epidemiológicos han demostrado que polimorfismos de dicha enzima se asocian con un incremento en el índice íntima/media de la carótida y con una mayor predisposición a padecer algún tipo de patología vascular<sup>56</sup>. Variantes genéticas de FLAP y LTA4H también se han involucrado en el incremento de infarto de miocardio e ictus en diferentes poblaciones<sup>83,84</sup>. En el estudio clínico CODE, individuos que habían sufrido infarto de miocardio y que presentan las variantes génicas de FLAP y LTA4H implicadas en el incremento de infarto de miocardio e ictus, se trataron con un inhibidor de FLAP, el DG-031, frente a placebo. Los resultados de este estudio mostraron que el DG-031 era capaz de disminuir de manera dosis-dependiente los niveles de biomarcadores asociados con el aumento en el número de infartos de miocardio, como son el LTB4 y la mieloperoxidasa<sup>79</sup>. Por otra parte, estudios *ex vivo* realizados con neutrófilos de sujetos que presentaban las variantes

genéticas para FLAP y que han sufrido un infarto de miocardio, han demostrado que dichos neutrófilos producen más LTB<sub>4</sub> que los de individuos sanos<sup>84</sup>. Nuestro trabajo ha puesto de manifiesto que los niveles plasmáticos de LTB<sub>4</sub> en pacientes con SCASEST, se encuentran incrementados a lo largo de todo el estudio, respecto a los controles sanos. Los niveles plasmáticos de LTB<sub>4</sub> que presentaban los pacientes con enfermedad coronaria estable, estaban al mismo nivel que los niveles de los pacientes con SCASEST, e incrementados en relación a los sujetos sanos. Estos datos nos muestran que los sujetos que presentan enfermedad coronaria, tienen altos niveles de LTB<sub>4</sub> en su sangre, respecto a los individuos sin patología coronaria manifiesta. Los resultados presentados en la parte II de esta tesis, en pacientes con aterosclerosis carotídea, también muestran que presentan altos niveles de LTB<sub>4</sub> en su sangre en relación a los sujetos sanos. Por lo tanto, podemos decir que dicho metabolito se encuentra incrementado durante las proceos aterotrombóticos agudos (SCASEST) y crónicos (enfermedad coronaria estable y aterosclerosis carotídea), en relación a los controles. Son necesarios más estudios, con mayor número de pacientes, para valorar el papel del LTB<sub>4</sub> como posible marcador de riesgo cardiovascular.

Aparte de los parámetros inflamatorios mostrados en esta tesis en los sujetos con SCASEST, se realizaron estudios adicionales para caracterizar el estado inflamatorio de estos pacientes después de haber sufrido el evento coronario. Presentaban altas concentraciones circulantes tanto de PCR como de CD40L, respecto a pacientes estables y a sujetos sanos (datos no mostrados). Esas concentraciones disminuyeron a lo largo de los 6 meses que duró el estudio, normalizando los valores en relación a los sujetos sanos y estables. También se midieron los niveles de catepsina D. Se trata de una enzima lisosomal que favorece la acumulación de LDL y la formación de células espumosas. Los pacientes con SCASEST presentaban altos niveles de catepsina D respecto de los pacientes estables y sanos, normalizándose estos valores a lo largo del estudio, como en los casos anteriores. Los niveles de catepsina D, además, se correlacionaron positivamente con los de CD40L a lo largo de todo el estudio (día 0, mes 2 y mes 6), pero no con los niveles de PCR.

## **2.- MODULACIÓN TERAPEÚTICA EN PACIENTES CON SCASEST**

Como hemos mencionado en el apartado anterior, una de las posibles funciones de los biomarcadores es la identificación de poblaciones de alto riesgo que podrían beneficiarse de tratamientos más intensivos frente a las de bajo riesgo. En este sentido, las estatinas han sido parte primordial en el armamento farmacológico de los clínicos, para el tratamiento de las enfermedades coronarias, tanto por su gran efecto hipolipemiante como por sus propiedades inmunomoduladoras y antiinflamatorias. Muchos de los biomarcadores mencionados anteriormente ven modificada su expresión por el tratamiento con las mismas.

Las estatinas, constituyen actualmente la terapia más eficaz para disminuir los niveles de colesterol plasmático, factor de riesgo clave en la aterotrombosis. Entre las más potentes existentes actualmente, destacan la atorvastatina y la rosuvastatina, alcanzando reducciones de hasta un 60% en los niveles de colesterol LDL con respecto a los valores pre-tratamiento. Estudios clínicos como el MIRACL<sup>167</sup> pusieron de manifiesto el efecto beneficioso de las estatinas incluso en pacientes normocolesterolémicos con aterosclerosis. En este estudio, pacientes tratados con atorvastatina a dosis de 80 mg/día presentaban una reducción significativa en los eventos isquémicos cuando lo comparaban con pacientes tratados con placebo<sup>167</sup>. Trabajos posteriores también han demostrado que la reducción en los niveles de colesterol LDL no explica completamente la mejor evolución de los pacientes tratados con dosis altas de estatinas, sugiriendo la contribución de los efectos antiinflamatorios de esta clase de medicamentos a la mejora presentada en estos enfermos<sup>20,49</sup>.

Estudios de prevención primaria y secundaria han demostrado que la terapia con estatinas disminuye de forma significativa la morbi-mortalidad por causa cardiovascular aún utilizando dosis bajas o moderadas de estatinas<sup>1,163,167,170</sup>. En los últimos años han surgido nuevos ensayos que evidencian mejores resultados con un tratamiento intensivo con estatinas frente a las dosis bajas<sup>32,50,105,145</sup>. El estudio PROVE-IT demuestra que la terapia intensiva con atorvastatina (80 mg/día) reduce la incidencia de eventos cardiovasculares comparada con el tratamiento moderado con pravastatina (40 mg/día), después de un SCA<sup>32</sup>. Más recientemente, el estudio SPARCL demostró que la terapia intensiva con atorvastatina 80 mg/día reduce la recurrencia de ictus, mientras que la terapia convencional con dosis bajas o moderadas no mostraba tal efecto<sup>8,188</sup>. Otros estudios han demostrado que el tratamiento intensivo con atorvastatina comparado con tratamientos con otras estatinas, reduce la progresión de la aterosclerosis coronaria y carotídea<sup>141</sup>.

Nuestro grupo diseñó un estudio en pacientes con SCASEST, a los que se trataba precoz e intensivamente con atorvastatina (80mg/día), frente al tratamiento convencional que podía incluir estatinas o no. El tratamiento intensivo disminuyó significativamente los niveles de colesterol total y colesterol LDL respecto al tratamiento convencional en pacientes con SCASEST. Los niveles de colesterol HDL y triglicéridos también se encontraban disminuidos en el grupo con tratamiento intensivo frente al tratamiento convencional, aunque esta disminución no llegó a obtener significación estadística. Estos resultados están en consonancia con múltiples estudios de prevención secundaria<sup>32,50,105,145</sup>, en los que se demostraba que el tratamiento intensivo con estatinas consigue disminuir los niveles lipídicos en mayor medida que el tratamiento convencional. De hecho, en el estudio PROVE-IT se consiguió un descenso de hasta un 49% en los niveles de colesterol LDL con el tratamiento intensivo con atorvastatina frente al tratamiento moderado<sup>32</sup>.

La capacidad demostrada de estos fármacos para reducir el número de células inflamatorias y la actividad de las mismas dentro de las placas ateromatosas<sup>6,165</sup>, puede ser la base de los beneficios adicionales obtenidos con la terapia intensiva<sup>20</sup> en relación a la convencional. Otros autores han observado que muchas de las células inflamatorias presentes en las lesiones



ateroscleróticas sobreexpresan el gen de la HMG-CoA reductasa<sup>190</sup>, otra posible explicación a por qué las estatinas pueden ser más beneficiosas a la hora de disminuir la inflamación. Como hemos mencionado anteriormente, la PCR es un marcador de riesgo cardiovascular, asociado principalmente a fenómenos inflamatorios. En el ensayo PROVE-IT, los pacientes que alcanzaban valores de PCR<2mg/dl, presentaban un mejor pronóstico. De este modo, los pacientes que conseguían un LDLc<70mg/dl y una PCR<2mg/dl eran los que mejor pronóstico tenían<sup>157</sup>. El estudio MIRACL demostró que la terapia intensiva con atorvastatina a dosis de 80 mg/día disminuyó un 34% los niveles de CRP a las 16 semanas comparándola con placebo<sup>101</sup>.

En nuestro trabajo, el tratamiento intensivo con atorvastatina durante 2 meses disminuyó los niveles plasmáticos PGE2 y la actividad catalítica en plasma de la MMP-9 en pacientes con SCASEST en relación al grupo con tratamiento convencional. La PGE2 y la MMP-9 son moléculas sintetizadas principalmente por las células inflamatorias, linfocitos y monocitos/macrófagos, tanto en la placa como en la sangre circulante, y están implicadas en mecanismos de inestabilidad y rotura de la misma<sup>36,75</sup>, como hemos mencionado a lo largo de esta tesis. Otros trabajos realizados en monocitos circulantes de pacientes hipercolesterolémicos han demostrado también que las estatinas son capaces de reducir los niveles de PCR<sup>74</sup>, la expresión de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ <sup>172</sup>, IL-6, IL-8, MCP-1 y moléculas de adhesión<sup>153,156</sup>. A nivel de las placas ateroscleróticas, diferentes grupos, entre ellos el nuestro, han demostrado que el tratamiento con estatinas disminuye la expresión de la PGES y de la MMP-9, así como los niveles plasmáticos de PGE2 en pacientes con aterosclerosis carotídea, ya durante el primer mes de tratamiento<sup>38,126</sup>. Aparte, nuestros resultados muestran la existencia de una correlación positiva entre los niveles plasmáticos de PGE2 y los niveles de actividad catalítica de la MMP-9 en los pacientes con SCASEST. El hecho de que la terapia intensiva y precoz con atorvastatina disminuya la producción de PGE2 y la actividad catalítica de la MMP-9 a nivel plasmático, sugiere una reducción de la inflamación a nivel sistémico haciendo que probablemente las células que ingresan en la placa estén menos “activas”. Estos datos nos proporcionan un mecanismo adicional a través del cual, la terapia intensiva con atorvastatina podría disminuir la incidencia de eventos vasculares agudos ayudando a estabilizar la placa aterosclerótica.

Hemos mostrado que los niveles de LTB4 se encuentran incrementados en el plasma de los pacientes con SCASEST, coronarios estables y con aterosclerosis carotídea, respecto a los controles sanos. No existen datos sobre la modulación terapéutica de dicho metabolito por el tratamiento con estatinas. En este sentido, nuestros resultados muestran que el tratamiento intensivo con estatinas durante 2 meses disminuyó, aunque no significativamente, los valores encontrados en los pacientes tratados con tratamiento convencional. Cabe destacar que el grupo de pacientes con tratamiento convencional presentaba niveles plasmáticos significativamente incrementados de LTB4 en relación a los individuos control. Aunque el tratamiento intensivo con atorvastatina no normalizó los niveles de LTB4, sí consiguió disminuirlos en relación al tratamiento convencional. Así, la reducción de los niveles plasmáticos de LTB4 podría representar otro potencial mecanismo a través del cual la terapia intensiva con atorvastatina conseguiría mejores resultados que la terapia convencional.

El NF- $\kappa$ B también está modulado por el tratamiento con estatinas. Diferentes estudios tanto *in vivo* como *in vitro* han demostrado que dicho tratamiento es capaz de disminuir la activación de NF- $\kappa$ B e inhibir la expresión de moléculas dependientes de él. Nuestros datos muestran que el tratamiento precoz e intensivo con atorvastatina durante 2 meses no consiguió disminuir significativamente los niveles de actividad de NF- $\kappa$ B en relación al grupo con tratamiento convencional. En este sentido, nuestro grupo ha publicado que el tratamiento con atorvastatina disminuye significativamente la activación de NF- $\kappa$ B en un modelo de aterosclerosis experimental y en cultivos primarios de CMLV<sup>20</sup>. Estudios en pacientes, realizados también en nuestro laboratorio, han demostrado que el tratamiento intensivo durante 1 mes con atorvastatina 80mg/día redujo la activación de NF- $\kappa$ B en las PBMCs de pacientes con estenosis carotídea<sup>126</sup>, aunque en este estudio el grupo comparador no recibía estatinas. Estos datos sugieren que posiblemente la falta de significación estadística en este trabajo se debió al bajo número de pacientes estudiados.

En resumen, los pacientes con SCASEST presentan un incremento en la actividad de NF- $\kappa$ B en las PBMCs, y un aumento de los niveles plasmáticos de PGE2, y de la actividad catalítica de la MMP-9 en relación a sujetos con enfermedad coronaria estable y a sujetos control. En cambio, los niveles de LTB4 estaban igualmente incrementados que los pacientes estables. El tratamiento precoz e intensivo con atorvastatina durante 2 meses, redujo los niveles plasmáticos de PGE2 y la actividad catalítica de la MMP-9 comparándolo con la terapia convencional. Estos datos nos proporcionan mecanismos adicionales que explicarían la superioridad de la terapia intensiva con estatinas frente a la terapia convencional después de un SCASEST.

A pesar del avance en el conocimiento de la fisiopatología de la aterotrombosis, esta patología continúa siendo la primera causa de muerte en el mundo. De ahí la necesidad de desarrollar estrategias para detectar la enfermedad antes de la presencia de síntomas y usar en forma más agresiva y selectiva el arsenal terapéutico que tenemos a nuestro alcance. Tanto la genética como las modernas técnicas de imagen no invasiva y los biomarcadores pueden ser claves en estos objetivos. Por otra parte no hay que pensar en el empleo de un solo biomarcador. Posiblemente el uso de varios, que idealmente nos den información sobre distintos niveles de la patogenia de la aterotrombosis, será más rentable desde el punto de vista pronóstico. A esta aproximación de multimarcadores probablemente se debería unir la información de las técnicas de imagen e incluso los marcadores de predisposición genética para darnos las claves del camino hacia una mejor prevención cardiovascular.

### 3.- IMPLICACIÓN DE LA VÍA 5-LO Y LTB<sub>4</sub> EN LA PATOLOGÍA ATEROSCLERÓTICA

Hace más de 20 años, Samuelsson et al.<sup>164</sup> identificaron a los leucotrienos como una clase de eicosanoides derivados de la acción de la enzima 5-LO a través del metabolismo del ácido araquidónico. Estos mediadores lipídicos participan en una gran variedad de procesos inflamatorios, tales como alergia, asma, artritis reumatoide, cáncer y aterosclerosis<sup>146,150</sup>. En los últimos 10 años, han surgido una gran cantidad de estudios implicando a estas moléculas en la patogénesis de las enfermedades cardiovasculares. Nuestros datos revelan que pacientes con aterosclerosis carotídea presentan altos niveles de LTB<sub>4</sub> en el plasma, en relación a los sujetos control. Los altos niveles plasmáticos de LTB<sub>4</sub> podrían constituir un posible biomarcador de dicha patología. Para confirmarlo serían necesario estudios con una gran población.

Hemos mostrado que los altos niveles circulantes de LTB<sub>4</sub> en el plasma de los pacientes ateroscleróticos se correspondían con un incremento en la expresión génica de las enzimas 5-LO, FLAP y LTA4H, en los monocitos circulantes de los pacientes con aterosclerosis carotídea frente a los sujetos sanos. Estos resultados ponen de manifiesto que los pacientes con aterosclerosis carotídea, presentan a nivel sistémico, un “ambiente proinflamatorio”, propiciado por el incremento en la expresión de las enzimas, 5-LO, LTA4H, FLAP y por su producto, LTB<sub>4</sub>. Éste induce el aumento de la expresión de otra molécula quimioattractante, MCP-1<sup>88</sup>, existiendo una interrelación entre ambas moléculas en la patología aterosclerótica<sup>4,177</sup>. Nuestros resultados evidencian que se produce una correlación positiva y significativa entre los niveles génicos de la 5-LO y el MCP-1 en las PBMCs de los pacientes ateroscleróticos.

El LTB<sub>4</sub> secretado por los monocitos circulantes al torrente sanguíneo necesita unirse a sus receptores para ejercer sus acciones. Hasta el momento se han descrito dos receptores capaces para unir LTB<sub>4</sub>, el BLT1 y el BLT2. BLT1 es el receptor de alta afinidad y hasta ahora el único implicado en procesos proinflamatorios, además de quimiotácticos y proliferativos. El BLT2 es el receptor de baja afinidad y hasta la fecha se le ha implicado junto con el BLT1 en procesos de quimiotaxis y proliferación. Ambos receptores, tienen diferente distribución. BLT1 está presente principalmente en células proinflamatorias como monocitos, macrófagos, linfocitos y neutrófilos. En cambio, BLT2 está localizado más ubicuamente, estando presente en la mayoría de los tejidos del organismo y también en las células proinflamatorias. Estudiamos la expresión génica de ambos receptores en las PBMCs de los pacientes, encontrando que los monocitos circulantes de pacientes ateroscleróticos presentaban una mayor expresión génica de BLT1 y de BLT2 en relación a los controles sanos. Estos resultados nos muestran que la sobreexpresión génica que se produce en los monocitos circulantes es evidente tanto a nivel de las enzimas que sintetizan LTB<sub>4</sub> como de sus receptores, por lo que se puede producir una activación autocrina por parte del LTB<sub>4</sub> en las propias células que lo sintetizan, fomentando así la inflamación.

Como hemos mencionado a lo largo del desarrollo de esta tesis, uno de los principales factores proinflamatorios descritos en aterosclerosis, es el factor nuclear NF- $\kappa$ B. Nuestros datos muestran que en monocitos en cultivo LTB<sub>4</sub> es capaz de incrementar la actividad de unión al DNA de NF- $\kappa$ B de manera dependiente del tiempo y de la dosis. Además, demostramos que el complejo NF- $\kappa$ B activado por LTB<sub>4</sub> está formado por el heterodímero p50/p65, produciéndose un incremento en la translocación nuclear de la subunidad p65 cuando las células estaban en presencia de LTB<sub>4</sub>. Además, a medida que LTB<sub>4</sub> induce la activación de NF- $\kappa$ B a lo largo del tiempo, se incrementa la fosforilación de la subunidad inhibitoria I $\kappa$ B $\alpha$  y se disminuyen los niveles citoplasmáticos de la misma, favoreciendo el paso del complejo NF- $\kappa$ B al interior nuclear.

Para profundizar en los mecanismos intracelulares inducidos por LTB<sub>4</sub>, utilizamos una línea celular monocítica. Los datos nos muestran que LTB<sub>4</sub> incrementa la actividad de unión al DNA de NF- $\kappa$ B, de manera dependiente del tiempo y de la dosis, a través de la unión a sus dos receptores, BLT1 y BLT2. El tratamiento con los antagonistas específicos para cada uno de ellos inhibió tanto la translocación de la subunidad p65 al interior nuclear, como la activación de NF- $\kappa$ B. La activación de NF- $\kappa$ B implica, como es sabido, la disociación de la subunidad inhibitoria I $\kappa$ B $\alpha$ , y su posterior degradación. En este sentido, nuestros resultados indican que LTB<sub>4</sub> inducía la fosforilación de dicha subunidad a través de BLT1 y BLT2, ya que el antagonismo de ambos receptores inhibió dicha fosforilación. La mayoría de los estudios realizados con los receptores de LTB<sub>4</sub>, implican principalmente al BLT1 en la aterosclerosis, no existiendo apenas datos de la implicación del BLT2 en dichos procesos. Existen estudios que demuestran que la activación de NF- $\kappa$ B es dependiente de BLT1 en diferentes modelos celulares<sup>13,88,97</sup>. Más aún, un estudio realizado en queratinocitos humanos descarta la implicación del receptor BLT2 en la activación de NF- $\kappa$ B inducida por LTB<sub>4</sub>, afirmando que dicha activación es totalmente independiente de BLT2<sup>97</sup>. Esta controversia, con respecto a lo obtenido con nuestros estudios, puede ser debida a que están realizados en diferentes líneas celulares. Podemos decir que los mecanismos de señalización intracelular mediados por LTB<sub>4</sub> son específicos de cada tipo celular, siendo necesarios más estudios para definir bien la señalización específica de LTB<sub>4</sub> a través de cada receptor. Nuestros resultados abren una puerta a la investigación del receptor BLT2 y su implicación en procesos inflamatorios, y no solamente en proliferativos.

En los últimos años se han realizado diferentes estudios implicando al BLT1 en procesos de hiperplasia y dermatitis alérgica<sup>13,97</sup>, además de los procesos ateroscleróticos<sup>100,134,148</sup>, quimiotácticos y proliferativos<sup>88,183</sup>. Los mecanismos intracelulares que activan la transcripción génica dependiente de NF- $\kappa$ B, implican la fosforilación de diferentes quinasas, encargadas de la activación de NF- $\kappa$ B. Varios grupos han descrito la implicación de estas familias de quinasas en la señalización inducida por LTB<sub>4</sub>, en una gran variedad de sistemas experimentales<sup>13,88,97,183</sup>. Nosotros nos centramos en el estudio de la ruta de la MAPKs y de la PI3K/AKT. Nuestros resultados demuestran que LTB<sub>4</sub>, en

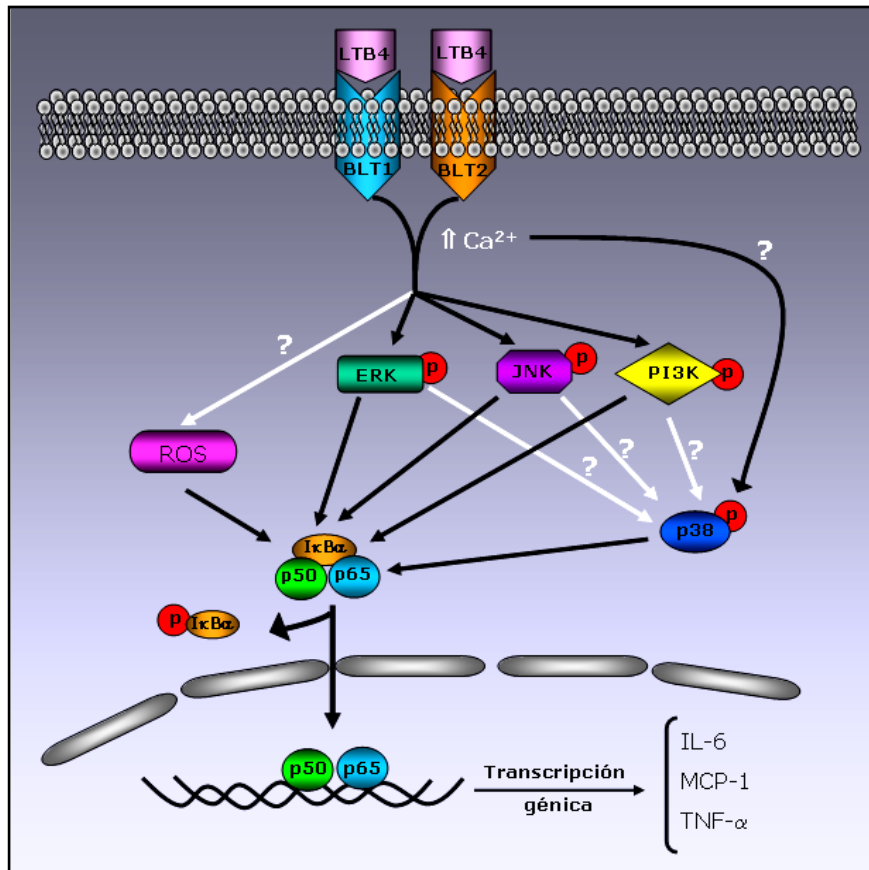
monocitos en cultivo, es capaz de inducir la fosforilación de ERK1/2, JNK1/2 y AKT en un mecanismo dependiente de BLT1 y BLT2, y que además, la activación de estas quinasas conduce al incremento en la activación de NF- $\kappa$ B, pues el tratamiento de las células con inhibidores selectivos para cada una de las quinasas anteriores disminuye la activación de NF- $\kappa$ B inducida por LTB<sub>4</sub>. Podemos concluir que LTB<sub>4</sub>, vía BLT1 y BLT2 es capaz de aumentar la fosforilación de ERK1/2, JNK1/2 y AKT, siendo estas quinasas unas de las responsables en el incremento de la activación del factor nuclear NF- $\kappa$ B en monocitos en cultivo. Además, hemos demostrado que LTB<sub>4</sub> es capaz de inducir la fosforilación de p38 en un mecanismo independiente de BLT1 y BLT2, ya que el antagonismo de ambos receptores no moduló la activación de p38. Sin embargo, la inhibición de dicha quinasa disminuyó la activación de NF- $\kappa$ B inducida por LTB<sub>4</sub>. Estos resultados nos sugieren que LTB<sub>4</sub> es capaz de activar NF- $\kappa$ B a través de mecanismos independientes de la señalización mostrada en nuestros resultados. Por ejemplo, es sabido que la unión de LTB<sub>4</sub> a sus receptores induce un aumento en la concentración de Ca<sup>2+</sup> y éste podría ser el responsable directa o indirectamente de incrementar la activación de p38 y otras rutas alternativas que no se han estudiado en esta tesis, como las rutas implicadas en la producción de estrés oxidativo y de radicales de oxígeno. En este sentido, hemos observado que el tratamiento con antioxidantes como el DPI y el Tiron, es capaz de disminuir la activación de NF- $\kappa$ B inducida por LTB<sub>4</sub>. De acuerdo con estos datos, existen estudios demostrando que la ingesta de dieta rica en ácidos omega 3, que disminuyen el estrés oxidativo, inhibe la actividad de la 5-LO, los niveles de LTB<sub>4</sub> y la peroxidación lipídica en PBMCs de pacientes con enfermedad renal avanzada<sup>179</sup>. Un estudio realizado en CMLV muestra que la angiotensina II induce la producción de LTB<sub>4</sub>, en un mecanismo dependiente de la enzima NADPH oxidasa generando especies reactivas de O<sub>2</sub><sup>2-</sup>. Todo este proceso no tiene lugar cuando se inhibe la enzima 5-LO<sup>122</sup>. Estos datos nos muestran que la señalización intracelular inducida por LTB<sub>4</sub> activa multitud de señales que son específicas del tipo celular, siendo necesarios más estudios para clarificar los mecanismos intracelulares mediados por LTB<sub>4</sub>.

Siguiendo con los estudios para desentrañar el papel inflamatorio del LTB<sub>4</sub>, analizamos la expresión de citoquinas proinflamatorias inducidas por el tratamiento con dicho metabolito. Observamos que LTB<sub>4</sub> incrementa la expresión génica, de manera dependiente del tiempo, de las citoquinas proinflamatorias IL-6 y TNF- $\alpha$  y de la quimioquina MCP-1 en monocitos en cultivo. El incremento génico de estas citoquinas se produjo a través de la unión a ambos receptores, BLT1 y BLT2, y en un mecanismo dependiente de NF- $\kappa$ B, ya que el tratamiento con los antagonistas de los receptores y con los inhibidores de NF- $\kappa$ B disminuyó dicha expresión. Datos similares a los observados en nuestro estudio han sido mostrados por otros grupos en monocitos humanos<sup>88</sup> y neutrófilos<sup>26</sup>. Además, observamos que la expresión de estas citoquinas es dependiente de la activación de quinasas específicas. Así, las quinasas ERK1/2, JNK1/2, p38 y PI3K/AKT estaban implicadas en el incremento en la expresión de IL-6, TNF- $\alpha$  y MCP-1. Específicamente, la expresión de IL-6 se debía exclusivamente a la activación de la ruta de las MAPKs al completo, ya que los

inhibidores de ERK1/2, p38 y JNK, redujeron la expresión de dicha citoquina. En el caso de TNF- $\alpha$  fueron los inhibidores de ERK1/2, JNK1/2 y PI3K/AKT los que disminuyeron su expresión. Finalmente, la expresión de MCP-1 fue dependiente de ERK1/2, JNK1/2 y PI3K/AKT, aunque también el tratamiento con el inhibidor de la NADPH oxidasa, Tiron, disminuyó la expresión de la quimioquina en monocitos tratados con LTB<sub>4</sub>. Todos estos datos nos sugieren que el tratamiento con LTB<sub>4</sub> es capaz de activar diferentes rutas de señalización que se traducen en un aumento en la expresión de proteínas inflamatorias implicadas en la patología aterosclerótica.

No observamos en ningún caso efecto aditivo en los parámetros estudiados, cuando tratamos a los monocitos con ambos antagonistas conjuntamente. Este hecho pudo deberse a que los efectos observados con los antagonistas por separado ya eran bastante considerables, dejando pocas posibilidades de que pudiesen tener un efecto aditivo. Además, descartamos que el tratamiento con U-75302 inhibiese el BLT2 y que Ly-255283 inhibiese BLT1 ya que, como hemos mencionado anteriormente, las concentraciones utilizadas para cada uno de ellos son específicas para su receptor. Así el U-75302, el antagonista específico de BLT1, tiene una IC<sub>50</sub> de 1  $\mu$ M para BLT1 y >10 mM para BLT2. Ly-255283, el antagonista específico para BLT2, tiene una IC<sub>50</sub> >10  $\mu$ M para BLT1 y ~1  $\mu$ M para BLT2. Las concentraciones utilizadas en nuestros estudios han sido de 0.1  $\mu$ mol/L para ambos antagonistas, asegurándonos de que son específicas para cada uno de ellos.

Podemos concluir que en monocitos en cultivo, LTB<sub>4</sub>, vía BLT1 y BLT2, activa las quinasas ERK1/2, JNK, PI3K/AKT y el factor nuclear NF- $\kappa$ B. Estos mecanismos incrementan la expresión de genes proinflamatorios como IL-6, TNF- $\alpha$  y MCP-1 (Figura 46). Nuestros hallazgos añaden un mecanismo adicional, nuevo hasta el momento, implicando al receptor BLT2 en el aumento de la inflamación en la patología aterosclerótica. Estos datos se correlacionan con los encontrados en las PBMCs de los pacientes con aterosclerosis carotídea, que mostraban un incremento en la expresión de dicho receptor en relación a los sujetos sanos.

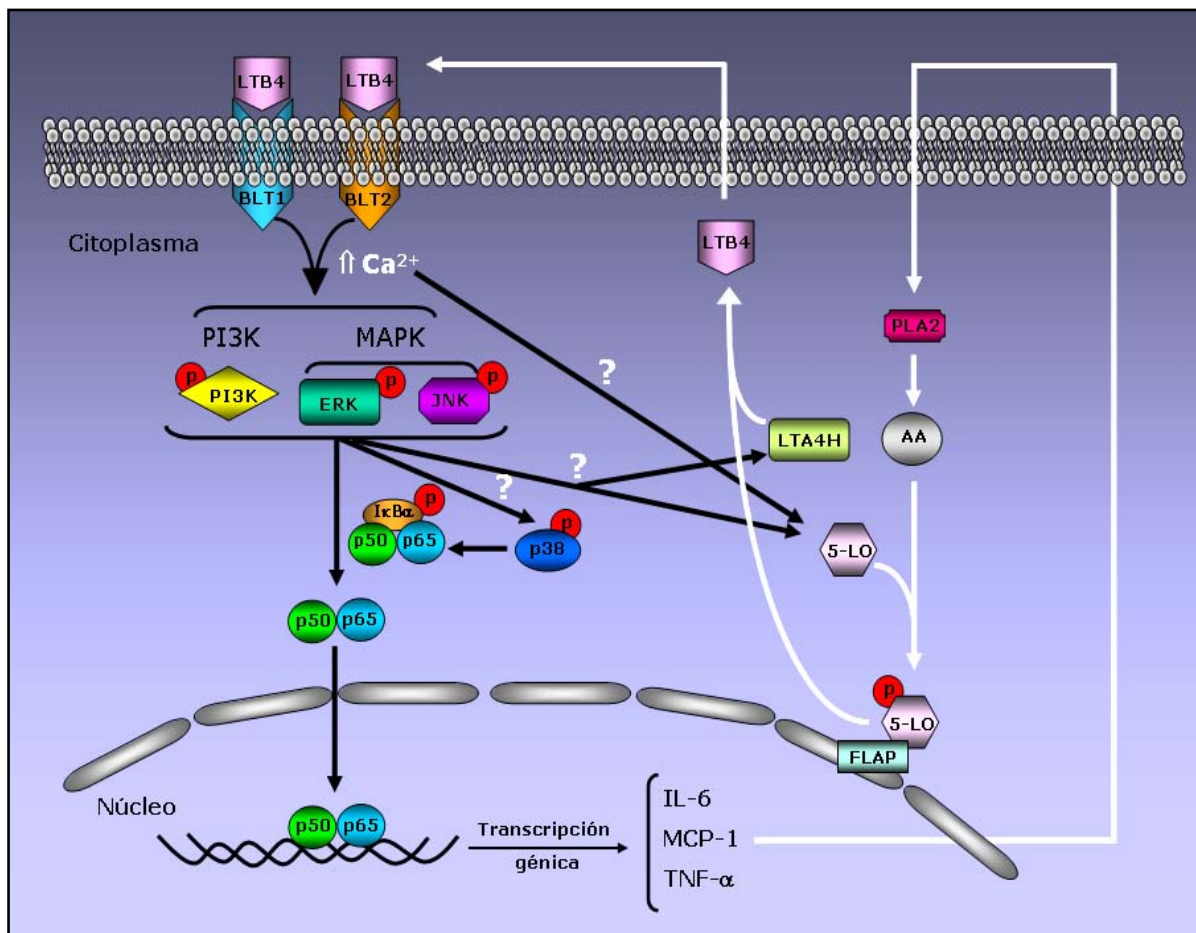


**Figura 46. Señalización inducida por la unión de LTB4 a sus receptores BLT1 y BLT2.**

La unión de LTB4 a sus receptores implica un aumento en los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular que activa la ruta de señalización descrita anteriormente, además de otras rutas alternativas<sup>90,146,164,180</sup>. El incremento en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  favorece la activación de la 5-LO, pero por otro lado, también posee en su molécula tres lugares diferentes de fosforilación: dos de ellos conducen a su activación (p38 y ERK) y el otro a su inhibición (PKA)<sup>149,150,164</sup>. Estos datos, junto con los resultados obtenidos en nuestro estudio *in vitro*, nos hicieron plantearnos si ese aumento en los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$ , y en la activación de las quinasas capaces de activar la 5-LO, ERK1/2 y p38 inducido por LTB4 en monocitos, podría repercutir en una activación de dicha enzima. Se produciría así un mecanismo de retroalimentación positiva, siendo el LTB4 capaz de activar su propia ruta de síntesis, aumentando su secreción y como consecuencia fomentando todos los mecanismos inflamatorios dando lugar a una inflamación crónica. Los resultados nos demuestran que la inhibición de la ruta 5-LO/LTA4H produjo un descenso en la activación de NF- $\kappa$ B, así como en la translocación nuclear de la subunidad p65, inducida por el tratamiento con LTB4. Además, la inhibición de la ruta 5-LO/LTA4H también disminuyó la expresión génica de las citoquinas IL-6, TNF- $\alpha$  y MCP-1 inducida por LTB4. Apoyándonos en datos publicados por nuestro grupo y en otros existentes en la



bibliografía, que indican que las citoquinas proinflamatorias como IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  son capaces de inducir la activación de NF- $\kappa$ B en un mecanismo dependiente de la ruta de la 5-LO<sup>10,194</sup>. Por tanto, nosotros proponemos la siguiente teoría: la inflamación, principalmente las citoquinas, producen un incremento en la activación de NF- $\kappa$ B. En un mecanismo paralelo, estas citoquinas activan la cPLA2, que hace que se libere ácido araquidónico de la membrana celular, aumentando la activación de la 5-LO y en consecuencia los niveles de LTB4. Este LTB4 se une a sus receptores, induciendo nuevamente la activación de NF- $\kappa$ B y estimulando la transcripción de citoquinas inflamatorias, que volverían a activar la enzima 5-LO produciéndose un efecto de retroalimentación positiva potenciando la inflamación (Figura 47). En todo caso, los datos presentados son preliminares y sería necesario realizar experimentos más específicos para demostrarla.



**Figura 47. Modelo propuesto para la señalización inducida por LTB4 e implicación del posible mecanismo de retroalimentación**



Para demostrar la relevancia de los datos mostrados con nuestros estudios *in vitro*, utilizamos muestras de placas carotídeas recogidas de pacientes que iban a ser sometidos a endarterectomía. Anteriormente ya hemos comentado que estos pacientes presentan mayor expresión de las proteínas 5-LO, FLAP, LTA4H, BLT1 y BLT2 en los monocitos circulantes, y de los niveles plasmáticos de LTB<sub>4</sub>, por lo que junto con los datos obtenidos *in vitro* podemos decir que los pacientes con aterosclerosis carotídea presentan a nivel sistémico un “ambiente proinflamatorio”. Para demostrar que este estado inflamatorio a nivel sistémico se trasladaba a nivel tisular, analizamos la expresión de la ruta 5-LO/LTA4H y de los receptores BLT1 y BLT2 en la zona inflamatoria de las placas, los hombros, en relación a la zona fibrosa, la cápsula, mediante inmunohistoquímica. La zona de los hombros presentaba una sobreexpresión de 5-LO, LTA4H y BLT1 en relación a la zona de la cápsula, no encontrando diferencias en la expresión de FLAP y BLT2 entre ambas zonas. Otros estudios realizados por diferentes grupos han demostrado un aumento de la expresión de 5-LO, FLAP y LTA4H en las arterias aorta, coronaria, y carotídea. Además cuanto más avanzadas eran las lesiones, mayor expresión de dichas enzimas se producía por los macrófagos presentes en las placas<sup>174,214</sup>. Más recientemente, el grupo de Cipollone ha demostrado el aumento de la expresión de 5-LO en placas de pacientes ateroscleróticos sintomáticos frente a no sintomáticos, que se correlacionaba con una mayor expresión de la MMP-9 y MMP-2. Además, la colocalización de estas MMPs con la 5-LO se producía principalmente en los macrófagos que se encontraban alrededor de la zona de los vasa vasorum<sup>40</sup>. Las placas de pacientes diabéticos también muestran una sobreexpresión de 5-LO, MMP-9 y MMP-2 en relación a los no diabéticos<sup>214</sup>. Estos datos sugieren un mecanismo novedoso que implica a la vía de la 5-LO en el proceso de desestabilización de placas.

En 2002, Mehrabian describió la implicación del gen de la 5-LO en el desarrollo de la aterosclerosis en un modelo experimental de ratón<sup>130</sup>. Posteriormente, diferentes grupos han utilizado este diseño experimental para demostrar la implicación de la ruta de la 5-LO y de los receptores BLT1 y BLT2 en la aterosclerosis. El grupo de Aiello utilizó por un lado ratones deficientes para ApoE y, por otro, para el receptor de LDL y los trató con un antagonista del receptor BLT1. Ambos modelos experimentales mostraron un descenso en la acumulación lipídica y en la adhesión de los monocitos a las áreas de superficie vascular<sup>4</sup>. Heller et al. también demostraron el efecto quimiotáctico ejercido por LTB<sub>4</sub> pero, en este caso, sobre las CMLV<sup>4,85</sup>. Este grupo también se ayudó de modelos de ratones deficientes para los genes de ApoE y BLT1 para demostrar que estos animales formaban una placa más pequeña que la de los ratones deficientes para ApoE. Además, neutrófilos aislados de ratones BLT1<sup>-/-</sup>, eran capaces de exhibir quimiotaxis en respuesta a LTB<sub>4</sub>, implicando a este receptor en fenómenos de quimiotaxis<sup>85</sup>. Este mismo grupo también demostró que LTB<sub>4</sub> activa la expresión de CD36 y de MCP-1/CCL2. Por lo tanto, implicaban al receptor BLT2, junto con el BLT1 en fenómenos ateroscleróticos<sup>85</sup>. El efecto quimiotáctico ejercido por LTB<sub>4</sub> es amplificado por el incremento que produce en la expresión de MCP-1. Además, LTB<sub>4</sub> promueve la conversión de

monocitos a células espumosas, por el aumento de la expresión de CD36 y la subsecuente acumulación de ácidos grasos<sup>177</sup>.

Aparte de todos los procesos mencionados anteriormente, también se ha implicado la ruta de la 5-LO en angiogénesis. En este sentido, se ha descrito que macrófagos presentes en la adventicia tienen mayor expresión de 5-LO en las áreas de neoangiogénesis de muestras humanas<sup>213</sup>. En modelos de ratones deficientes para ApoE, a los que se les daba una dieta rica en lípidos se encontró una sobreexpresión de la 5-LO por parte de los macrófagos existentes en las zonas de aneurismas aórticos. Por otro lado, ratones deficientes para ApoE y 5-LO presentaban una disminución en la actividad de la MMP-2 y MIP-1 $\alpha$ , y en consecuencia un menor número de aneurismas<sup>213</sup>. Estos datos ofrecen un mecanismo adicional a través del cual la ruta de la 5-LO participaría en el aumento de la inflamación de la pared vascular.

Nuestros resultados muestran que la expresión de las proteínas 5-LO, FLAP, LTA4H, BLT1 y BLT2 colocalizan con macrófagos y con CMLV presentes en las placas ateroscleróticas, demostrando que ambos tipos celulares son capaces de expresar las proteínas antes mencionadas. Además, la expresión de los receptores BLT1 y BLT2 colocaliza con la de 5-LO, FLAP y LTA4H, sugiriendo un posible efecto autocrino de LTB<sub>4</sub>, y el posible mecanismo de retroalimentación positiva que se puede dar en estas células, potenciando su acción inflamatoria. Se han observado resultados similares en distintos estudios colocalizando la expresión de estas proteínas con marcadores de células endoteliales, macrófagos y CMLV<sup>13,147,174,214</sup>. La zona de los hombros de las placas ateroscleróticas se caracteriza por la sobreexpresión de moléculas reguladas transcripcionalmente por NF- $\kappa$ B e implicadas en la aterosclerosis<sup>92</sup>. Se ha descrito que el NF- $\kappa$ B está activado durante el evento clínico, y podría estar implicado en la rotura de la placa y producir los síndromes coronarios agudos<sup>159</sup>. En concordancia con estos resultados, nuestro grupo ha demostrado que en estos pacientes el NF- $\kappa$ B activo está localizado preferentemente en la zona de los hombros<sup>127</sup>. Además, observamos que existe colocalización de NF- $\kappa$ B activo con 5-LO, LTA4H, FLAP, BLT1 y BLT2 en las placas de los pacientes, sugiriendo que la ruta 5-LO/LTA4H podría estar regulando la actividad transcripcional de este factor nuclear *in vivo*.

Diferentes estudios epidemiológicos, realizados en poblaciones con variantes genéticas para 5-LO, FLAP y LTA4H han puesto de manifiesto la relación entre los individuos que presentan dichas variantes y la incidencia de IAM, ictus y aterosclerosis de los mismos. Particularmente, los haplotipos Hap A y Hap B del gen FLAP descritos en poblaciones de Islandia, Reino Unido y Escocia confieren mayor riesgo de sufrir IAM e ictus a las personas que lo poseen<sup>82,84</sup>. Otras variantes genéticas del gen de la 5-LO también han sido implicadas en aterosclerosis<sup>56</sup>. Un estudio realizado en España con sujetos que presentaban las variantes genéticas mencionadas, ha demostrado una asociación entre éstas y el riesgo de sufrir un episodio coronario<sup>77</sup>. Todos estos datos llevaron al desarrollo de un estudio clínico en prevención secundaria, con un inhibidor de la enzima FLAP, el DG-031, en

pacientes que habían sufrido un IAM. Resultados preliminares han mostrado que el tratamiento con dicho inhibidor, en pacientes que tienen las variantes genéticas de FLAP y LTA4H, es capaz de disminuir en un 26% la concentración de LTB<sub>4</sub> producida por neutrófilos activados, en un 12% la de mieloperoxidasa, en un 27% la de LTE<sub>4</sub>, en un 25% los niveles de PCR y en un 15% los del péptido amiloide. Aunque este estudio ofrece muy buenos resultados, tenemos que tener en cuenta que se ha realizado en una población muy específica que presentaba variantes genéticas de alto riesgo. Sería por tanto necesario esperar a que se realicen estudios en otras poblaciones, con menor riesgo cardiovascular, que confirmen estos resultados.

En conclusión, nuestros resultados *in vivo* muestran que, pacientes con aterosclerosis carotídea presentan una sobreexpresión de 5-LO, LTA4H y BLT1 en la zona de los hombros respecto de la cápsula en las placas carotídeas y que las proteínas de la ruta 5-LO/LTA4H colocalizan con marcadores de macrófagos, CMLV y con el NF- $\kappa$ B activo. Además, la expresión génica de 5-LO, FLAP, LTA4H, BLT1 y BLT2 está incrementada en las PBMCs de los mismos, así como los niveles plasmáticos de LTB<sub>4</sub> en relación a los sujetos sanos. A nivel *in vitro*, nuestros datos muestran que, en monocitos en cultivo, LTB<sub>4</sub> vía receptores BLT1 y BLT2 activan las quinasas ERK1/2, JNK1/2 y PI3K/AKT que a su vez activan la ruta de NF- $\kappa$ B y regulan genes como IL-6, TNF- $\alpha$  y MCP-1. Además, hemos demostrado que la inhibición de la ruta 5-LO/LTA4H, también participa en la activación de NF- $\kappa$ B y genes proinflamatorios, como IL-6, TNF- $\alpha$  y MCP-1 inducida por LTB<sub>4</sub>, en un hipotético mecanismo de retroalimentación positiva. Estos datos pueden ser de ayuda para el desarrollo de nuevos fármacos que interfieran eficazmente con el proceso aterosclerótico.

# Conclusiones

## CONCLUSIONES:

**1.-** Los pacientes con SCASEST presentan a nivel sistémico un aumento de la activación del factor nuclear NF- $\kappa$ B, un incremento en los niveles de PGE2 y LTB4 y de la actividad gelatinolítica de la MMP-9, respecto a los valores encontrados en sujetos sanos.

**2.-** El tratamiento precoz e intensivo con atorvastatina a dosis de 80 mg/día durante 2 meses normaliza los niveles de PGE2 y la actividad de la MMP-9 en el plasma de pacientes con SCASEST.

**3.-** Los pacientes con aterosclerosis carotídea muestran un incremento en la expresión génica de 5-LO, FLAP, LTA4H, BLT1 y BLT2 en sus PBMCs, que se refleja en un aumento de los niveles plasmáticos de LTB4 respecto a individuos sanos. A nivel de las placas ateroscleróticas carotídeas, observamos una sobreexpresión de 5-LO, LTA4H y BLT1 en la zona de los hombros respecto de la cápsula. Además, todas las proteínas de la ruta y los receptores colocan con el factor nuclear NF- $\kappa$ B activo en las lesiones ateroscleróticas de dichos pacientes.

**4.-** LTB4 vía BLT1 y BLT2 activa las rutas de ERK, JNK, AKT y NF- $\kappa$ B, e incrementa la expresión de genes proinflamatorios, IL-6, MCP-1 y TNF- $\alpha$ . LTB4 también es capaz de activar su propia ruta de síntesis, y en consecuencia aumentar la inflamación a través de la activación de NF- $\kappa$ B y citoquinas proinflamatorias.

Por lo tanto, esta tesis doctoral refleja la implicación de las vías COX-2/PGE2 y 5-LO/LTB4 en los procesos aterotrombóticos agudos y crónicos. En este sentido, pone de manifiesto que la terapia intensiva con estatinas, en pacientes con SCASEST, es más efectiva que el tratamiento moderado en la reducción de la actividad de la vía COX-2/PGE2. Por otro lado, muestra nuevas dianas terapéuticas y abre una nueva vía para el desarrollo de futuros fármacos que interfieran eficazmente con la progresión de la aterotrombosis.

# **Bibliografía**

1. Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S) *Lancet* 1994; **344**:1383-89.
2. MRC/BHF Heart Protection Study of antioxidant vitamin supplementation in 20,536 high-risk individuals: a randomised placebo-controlled trial *Lancet* 2002; **360**:23-33.
3. Ahluwalia N, Lin AY, Tager AM, Pruitt IE, Anderson TJ, Kristo F, Shen D, Cruz AR, Aikawa M, Luster AD, Gerszten RE. Inhibited aortic aneurysm formation in BLT1-deficient mice. *J Immunol* 2007; **179**:691-97.
4. Aiello RJ, Bourassa PA, Lindsey S, Weng W, Freeman A, Showell HJ. Leukotriene B4 receptor antagonism reduces monocytic foam cells in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; **22**:443-49.
5. Aikawa M, Kim HS, Kuro-o M, Manabe I, Watanabe M, Yamaguchi H, Yazaki Y, Nagai R. Phenotypic modulation of smooth muscle cells during progression of human atherosclerosis as determined by altered expression of myosin heavy chain isoforms. *Ann N Y Acad Sci* 1995; **748**:578-85.
6. Aikawa M, Rabkin E, Sugiyama S, Voglic SJ, Fukumoto Y, Furukawa Y, Shiomi M, Schoen FJ, Libby P. An HMG-CoA reductase inhibitor, cerivastatin, suppresses growth of macrophages expressing matrix metalloproteinases and tissue factor in vivo and in vitro. *Circulation* 2001; **103**:276-83.
7. Akasaki Y, Liu G, Chung NH, Ehteshami M, Black KL, Yu JS. Induction of a CD4+ T regulatory type 1 response by cyclooxygenase-2-overexpressing glioma. *J Immunol* 2004; **173**:4352-59.
8. Amarenco P, Bogousslavsky J, Callahan A, III, Goldstein LB, Hennerici M, Rudolph AE, Sillsen H, Simunovic L, Szarek M, Welch KM, Zivin JA. High-dose atorvastatin after stroke or transient ischemic attack. *N Engl J Med* 2006; **355**:549-59.
9. Ambrose JA, Fuster V. The risk of coronary occlusion is not proportional to the prior severity of coronary stenoses. *Heart* 1998; **79**:3-4.
10. Anthonsen MW, Solhaug A, Johansen B. Functional coupling between secretory and cytosolic phospholipase A2 modulates tumor necrosis factor- $\alpha$ - and interleukin-1 $\beta$ -induced NF- $\kappa$ B activation. *J Biol Chem* 2001; **276**:30527-36.
11. Ardans JA, Blum A, Mangan PR, Wientroub S, Cannon RO, III, Wahl LM. Raloxifene-mediated increase in matrix metalloproteinase-1 production by activated monocytes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; **21**:1265-68.

12. Arend WP, Dayer JM. Cytokines and cytokine inhibitors or antagonists in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1990; **33**:305-15.
13. Back M, Bu DX, Branstrom R, Sheikine Y, Yan ZQ, Hansson GK. Leukotriene B4 signaling through NF-kappaB-dependent BLT1 receptors on vascular smooth muscle cells in atherosclerosis and intimal hyperplasia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; **102**:17501-6.
14. Back M, Qiu H, Haeggstrom JZ, Sakata K. Leukotriene B4 is an indirectly acting vasoconstrictor in guinea pig aorta via an inducible type of BLT receptor. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004; **287**:H419-H424.
15. Badimon JJ, Badimon L, Turitto VT, Fuster V. Platelet deposition at high shear rates is enhanced by high plasma cholesterol levels. In vivo study in the rabbit model. *Arterioscler Thromb* 1991; **11**:395-402.
16. Barnett SF, Bilodeau MT, Lindsley CW. The Akt/PKB family of protein kinases: a review of small molecule inhibitors and progress towards target validation. *Curr Top Med Chem* 2005; **5**:109-25.
17. Beloui O, Paramo JA, Orbe J, Benito A, Colina I, Monasterio A, Diez J. Monocyte cyclooxygenase-2 overactivity: a new marker of subclinical atherosclerosis in asymptomatic subjects with cardiovascular risk factors? *Eur Heart J* 2005; **26**:153-58.
18. Biasucci LM, Liuzzo G, Grillo RL, Caligiuri G, Rebuzzi AG, Buffon A, Summaria F, Ginnetti F, Fadda G, Maseri A. Elevated levels of C-reactive protein at discharge in patients with unstable angina predict recurrent instability. *Circulation* 1999; **99**:855-60.
19. Bigazzi R, Bianchi S. Insulin resistance, metabolic syndrome and endothelial dysfunction. *J Nephrol* 2007; **20**:10-14.
20. Blanco-Colio LM, Tunon J, Martin-Ventura JL, Egido J. Anti-inflammatory and immunomodulatory effects of statins. *Kidney Int* 2003; **63**:12-23.
21. Blatteis CM, Li S, Li Z, Feleder C, Perlik V. Cytokines, PGE2 and endotoxic fever: a re-assessment. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2005; **76**:1-18.
22. Boersma E, Mercado N, Poldermans D, Gardien M, Vos J, Simoons ML. Acute myocardial infarction. *Lancet* 2003; **361**:847-58.
23. Bogatcheva NV, Sergeeva MG, Dudek SM, Verin AD. Arachidonic acid cascade in endothelial pathobiology. *Microvasc Res* 2005; **69**:107-27.



24. Bombardier C, Laine L, Reicin A, Shapiro D, Burgos-Vargas R, Davis B, Day R, Ferraz MB, Hawkey CJ, Hochberg MC, Kvien TK, Schnitzer TJ. Comparison of upper gastrointestinal toxicity of rofecoxib and naproxen in patients with rheumatoid arthritis. VIGOR Study Group. *N Engl J Med* 2000; **343**:1520-8, 2.
25. Bourcier T, Sukhova G, Libby P. The nuclear factor kappa-B signaling pathway participates in dysregulation of vascular smooth muscle cells in vitro and in human atherosclerosis. *J Biol Chem* 1997; **272**:15817-24.
26. Brach MA, de VS, Arnold C, Gruss HJ, Mertelsmann R, Herrmann F. Leukotriene B4 transcriptionally activates interleukin-6 expression involving NF- $\kappa$ B and NF-IL6. *Eur J Immunol* 1992; **22**:2705-11.
27. Brand K, Page S, Rogler G, Bartsch A, Brandl R, Knuechel R, Page M, Kaltschmidt C, Baeuerle PA, Neumeier D. Activated transcription factor nuclear factor-kappa B is present in the atherosclerotic lesion. *J Clin Invest* 1996; **97**:1715-22.
28. Bresalier RS, Sandler RS, Quan H, Bolognese JA, Oxenius B, Horgan K, Lines C, Riddell R, Morton D, Lanos A, Konstam MA, Baron JA. Cardiovascular events associated with rofecoxib in a colorectal adenoma chemoprevention trial. *N Engl J Med* 2005; **352**:1092-102.
29. Brown DL, Hibbs MS, Kearney M, Loushin C, Isner JM. Identification of 92-kD gelatinase in human coronary atherosclerotic lesions. Association of active enzyme synthesis with unstable angina. *Circulation* 1995; **91**:2125-31.
30. Buffon A, Biasucci LM, Liuzzo G, D'Onofrio G, Crea F, Maseri A. Widespread coronary inflammation in unstable angina. *N Engl J Med* 2002; **347**:5-12.
31. Camejo G, Hurt-Camejo E, Wiklund O, Bondjers G. Association of apo B lipoproteins with arterial proteoglycans: pathological significance and molecular basis. *Atherosclerosis* 1998; **139**:205-22.
32. Cannon CP, Braunwald E, McCabe CH, Rader DJ, Rouleau JL, Belder R, Joyal SV, Hill KA, Pfeffer MA, Skene AM. Intensive versus moderate lipid lowering with statins after acute coronary syndromes. *N Engl J Med* 2004; **350**:1495-504.
33. Carter AM. Inflammation, thrombosis and acute coronary syndromes. *Diab Vasc Dis Res* 2005; **2**:113-21.
34. Chapman HA, Riese RJ, Shi GP. Emerging roles for cysteine proteases in human biology. *Annu Rev Physiol* 1997; **59**:63-88.

35. Chatterjee S. Role of oxidized human plasma low density lipoproteins in atherosclerosis: effects on smooth muscle cell proliferation. *Mol Cell Biochem* 1992; **111**:143-47.
36. Chen F, Eriksson P, Hansson GK, Herzfeld I, Klein M, Hansson LO, Valen G. Expression of matrix metalloproteinase 9 and its regulators in the unstable coronary atherosclerotic plaque. *Int J Mol Med* 2005; **15**:57-65.
37. Chen LY, Mehta P, Mehta JL. Oxidized LDL decreases L-arginine uptake and nitric oxide synthase protein expression in human platelets: relevance of the effect of oxidized LDL on platelet function. *Circulation* 1996; **93**:1740-1746.
38. Cipollone F, Fazia M, Iezzi A, Zucchelli M, Pini B, De CD, Uccchino S, Spigonardo F, Bajocchi G, Bei R, Muraro R, Artese L, Piattelli A, Chiarelli F, Cuccurullo F, Mezzetti A. Suppression of the functionally coupled cyclooxygenase-2/prostaglandin E synthase as a basis of simvastatin-dependent plaque stabilization in humans. *Circulation* 2003; **107**:1479-85.
39. Cipollone F, Fazia ML. COX-2 and atherosclerosis. *J Cardiovasc Pharmacol* 2006; **47 Suppl 1**:S26-S36.
40. Cipollone F, Mezzetti A, Fazia ML, Cuccurullo C, Iezzi A, Uccchino S, Spigonardo F, Bucci M, Cuccurullo F, Prescott SM, Stafforini DM. Association between 5-lipoxygenase expression and plaque instability in humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; **25**:1665-70.
41. Cipollone F, Prontera C, Pini B, Marini M, Fazia M, De CD, Iezzi A, Uccchino S, Boccoli G, Saba V, Chiarelli F, Cuccurullo F, Mezzetti A. Overexpression of functionally coupled cyclooxygenase-2 and prostaglandin E synthase in symptomatic atherosclerotic plaques as a basis of prostaglandin E(2)-dependent plaque instability. *Circulation* 2001; **104**:921-27.
42. Cominacini L, Anselmi M, Garbin U, Fratta PA, Stranieri C, Fusaro M, Nava C, Agostoni P, Keta D, Zardini P, Sawamura T, Lo C, V. Enhanced plasma levels of oxidized low-density lipoprotein increase circulating nuclear factor-kappa B activation in patients with unstable angina. *J Am Coll Cardiol* 2005; **46**:799-806.
43. Coon D, Gulati A, Cowan C, He J. The role of cyclooxygenase-2 (COX-2) in inflammatory bone resorption. *J Endod* 2007; **33**:432-36.
44. Crisby M, Nordin-Fredriksson G, Shah PK, Yano J, Zhu J, Nilsson J. Pravastatin treatment increases collagen content and decreases lipid content, inflammation, metalloproteinases, and cell death in human carotid plaques: implications for plaque stabilization. *Circulation* 2001; **103**:926-33.

45. Cuccurullo C, Fazia ML, Mezzetti A, Cipollone F. COX-2 expression in atherosclerosis: the good, the bad or the ugly? *Curr Med Chem* 2007; **14**:1595-605.
46. Cuenda A, Rousseau S. p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases. *Biochim Biophys Acta* 2007; **1773**:1358-75.
47. Cushing SD, Berliner JA, Valente AJ, Territo MC, Navab M, Parhami F, Gerrity R, Schwartz CJ, Fogelman AM. Minimally modified low density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein 1 in human endothelial cells and smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; **87**:5134-38.
48. Danesh J, Wheeler JG, Hirschfield GM, Eda S, Eiriksdottir G, Rumley A, Lowe GD, Pepys MB, Gudnason V. C-reactive protein and other circulating markers of inflammation in the prediction of coronary heart disease. *N Engl J Med* 2004; **350**:1387-97.
49. Davignon J. Beneficial cardiovascular pleiotropic effects of statins. *Circulation* 2004; **109**:III39-III43.
50. de Lemos JA, Blazing MA, Wiviott SD, Lewis EF, Fox KA, White HD, Rouleau JL, Pedersen TR, Gardner LH, Mukherjee R, Ramsey KE, Palmisano J, Bilheimer DW, Pfeffer MA, Califf RM, Braunwald E. Early intensive vs a delayed conservative simvastatin strategy in patients with acute coronary syndromes: phase Z of the A to Z trial. *JAMA* 2004; **292**:1307-16.
51. de Winther MP, Kanters E, Kraal G, Hofker MH. Nuclear factor kappaB signaling in atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; **25**:904-14.
52. De CR, Zampolli A. From asthma to atherosclerosis--5-lipoxygenase, leukotrienes, and inflammation. *N Engl J Med* 2004; **350**:4-7.
53. Dhillon AS, Hagan S, Rath O, Kolch W. MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene* 2007; **26**:3279-90.
54. Dillon RL, White DE, Muller WJ. The phosphatidyl inositol 3-kinase signaling network: implications for human breast cancer. *Oncogene* 2007; **26**:1338-45.
55. Dollery CM, McEwan JR, Henney AM. Matrix metalloproteinases and cardiovascular disease. *Circ Res* 1995; **77**:863-68.
56. Dwyer JH, Allayee H, Dwyer KM, Fan J, Wu H, Mar R, Lusis AJ, Mehrabian M. Arachidonate 5-lipoxygenase promoter genotype, dietary arachidonic acid, and atherosclerosis. *N Engl J Med* 2004; **350**:29-37.

57. Eisinger AL, Prescott SM, Jones DA, Stafforini DM. The role of cyclooxygenase-2 and prostaglandins in colon cancer. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2007; **82**:147-54.
58. Eriksson S, Wittfooth S, Pettersson K. Present and future biochemical markers for detection of acute coronary syndrome. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2006; **43**:427-95.
59. Fadini GP, Agostini C, Sartore S, Avogaro A. Endothelial progenitor cells in the natural history of atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2007; **194**:46-54.
60. Falk E, Shah PK, Fuster V. Coronary plaque disruption. *Circulation* 1995; **92**:657-71.
61. Farb A, Burke AP, Tang AL, Liang TY, Mannan P, Smialek J, Virmani R. Coronary plaque erosion without rupture into a lipid core. A frequent cause of coronary thrombosis in sudden coronary death. *Circulation* 1996; **93**:1354-63.
62. Fernandez-Ortiz A, Badimon JJ, Falk E, Fuster V, Meyer B, Mailhac A, Weng D, Shah PK, Badimon L. Characterization of the relative thrombogenicity of atherosclerotic plaque components: implications for consequences of plaque rupture. *J Am Coll Cardiol* 1994; **23**:1562-69.
63. Friedrich EB, Tager AM, Liu E, Pettersson A, Owman C, Munn L, Luster AD, Gerszten RE. Mechanisms of leukotriene B<sub>4</sub>-triggered monocyte adhesion. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; **23**:1761-67.
64. Funk CD. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science* 2001; **294**:1871-75.
65. Funk CD. Leukotriene modifiers as potential therapeutics for cardiovascular disease. *Nat Rev Drug Discov* 2005; **4**:664-72.
66. Fuster V. [Thrombus remodeling. Key factor in the progression of coronary atherosclerosis]. *Rev Esp Cardiol* 2000; **53 Suppl 1**:2-7.
67. Gaeta G, De MM, Cuomo S, Guarini P, Foglia MC, Bond MG, Trevisan M. Arterial abnormalities in the offspring of patients with premature myocardial infarction. *N Engl J Med* 2000; **343**:840-846.
68. Galis ZS, Khatri JJ. Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly. *Circ Res* 2002; **90**:251-62.

69. Galis ZS, Sukhova GK, Lark MW, Libby P. Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* 1994; **94**:2493-503.
70. Geng YJ, Libby P. Evidence for apoptosis in advanced human atheroma. Colocalization with interleukin-1 beta-converting enzyme. *Am J Pathol* 1995; **147**:251-66.
71. Gimbrone MA, Jr. Vascular endothelium: an integrator of pathophysiologic stimuli in atherosclerosis. *Am J Cardiol* 1995; **75**:67B-70B.
72. Giugliano RP, Braunwald E. The year in non-ST-segment elevation acute coronary syndrome. *J Am Coll Cardiol* 2007; **50**:1386-95.
73. Goldstein JL, Brown MS. Lipoprotein receptors and the control of plasma LDL cholesterol levels. *Eur Heart J* 1992; **13 Suppl B**:34-36.
74. Gomez-Gerique JA, Ros E, Olivan J, Mostaza JM, Vilardell M, Pinto X, Civeira F, Hernandez A, da Silva PM, Rodriguez-Botaro A, Zambon D, Lima J, Diaz C, Aristegui R, Sol JM, Chaves J, Hernandez G. Effect of atorvastatin and bezafibrate on plasma levels of C-reactive protein in combined (mixed) hyperlipidemia. *Atherosclerosis* 2002; **162**:245-51.
75. Gomez-Hernandez A, Martin-Ventura JL, Sanchez-Galan E, Vidal C, Ortego M, Blanco-Colio LM, Ortega L, Tunon J, Egido J. Overexpression of COX-2, Prostaglandin E synthase-1 and prostaglandin E receptors in blood mononuclear cells and plaque of patients with carotid atherosclerosis: regulation by nuclear factor-kappaB. *Atherosclerosis* 2006; **187**:139-49.
76. Gomez-Hernandez A, Sanchez-Galan E, Martin-Ventura JL, Vidal C, Blanco-Colio LM, Ortego M, Vega M, Serrano J, Ortega L, Hernandez G, Tunon J, Egido J. Atorvastatin reduces the expression of prostaglandin E2 receptors in human carotid atherosclerotic plaques and monocytic cells: potential implications for plaque stabilization. *J Cardiovasc Pharmacol* 2006; **47**:60-69.
77. Gonzalez P, Reguero JR, Lozano I, Moris C, Coto E. A functional Sp1/Egr1-tandem repeat polymorphism in the 5-lipoxygenase gene is not associated with myocardial infarction. *Int J Immunogenet* 2007; **34**:127-30.
78. Gough PJ, Gomez IG, Wille PT, Raines EW. Macrophage expression of active MMP-9 induces acute plaque disruption in apoE-deficient mice. *J Clin Invest* 2006; **116**:59-69.
79. Hakonarson H, Thorvaldsson S, Helgadóttir A, Gudbjartsson D, Zink F, Andresdóttir M, Manolescu A, Arnar DO, Andersen K, Sigurdsson A, Thorgeirsson G, Jonsson A, Agnarsson U, Björnsdóttir H, Gottskalksson G, Einarsson A, Gudmundsdóttir H, Adalsteinsdóttir AE,

- Gudmundsson K, Kristjansson K, Hardarson T, Kristinsson A, Topol EJ, Gulcher J, Kong A, Gurney M, Thorgeirsson G, Stefansson K. Effects of a 5-lipoxygenase-activating protein inhibitor on biomarkers associated with risk of myocardial infarction: a randomized trial. *JAMA* 2005; **293**:2245-56.
80. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med* 2005; **352**:1685-95.
81. Harrison DG. Endothelial function and oxidant stress. *Clin Cardiol* 1997; **20**:II-7.
82. Helgadóttir A, Gretarsdóttir S, St CD, Manolescu A, Cheung J, Thorleifsson G, Pasdar A, Grant SF, Whalley LJ, Hakonarson H, Thorsteinsdóttir U, Kong A, Gulcher J, Stefansson K, MacLeod MJ. Association between the gene encoding 5-lipoxygenase-activating protein and stroke replicated in a Scottish population. *Am J Hum Genet* 2005; **76**:505-9.
83. Helgadóttir A, Manolescu A, Helgason A, Thorleifsson G, Thorsteinsdóttir U, Gudbjartsson DF, Gretarsdóttir S, Magnusson KP, Gudmundsson G, Hicks A, Jonsson T, Grant SF, Sainz J, O'Brien SJ, Sveinbjornsdóttir S, Valdimarsson EM, Matthiasson SE, Levey AI, Abramson JL, Reilly MP, Vaccarino V, Wolfe ML, Gudnason V, Quyyumi AA, Topol EJ, Rader DJ, Thorgeirsson G, Gulcher JR, Hakonarson H, Kong A, Stefansson K. A variant of the gene encoding leukotriene A4 hydrolase confers ethnicity-specific risk of myocardial infarction. *Nat Genet* 2006; **38**:68-74.
84. Helgadóttir A, Manolescu A, Thorleifsson G, Gretarsdóttir S, Jonsdóttir H, Thorsteinsdóttir U, Samani NJ, Gudmundsson G, Grant SF, Thorgeirsson G, Sveinbjornsdóttir S, Valdimarsson EM, Matthiasson SE, Johannsson H, Gudmundsdóttir O, Gurney ME, Sainz J, Thorhallsdóttir M, Andresdóttir M, Frigge ML, Topol EJ, Kong A, Gudnason V, Hakonarson H, Gulcher JR, Stefansson K. The gene encoding 5-lipoxygenase activating protein confers risk of myocardial infarction and stroke. *Nat Genet* 2004; **36**:233-39.
85. Heller EA, Liu E, Tager AM, Sinha S, Roberts JD, Koehn SL, Libby P, Aikawa ER, Chen JQ, Huang P, Freeman MW, Moore KJ, Luster AD, Gerszten RE. Inhibition of atherogenesis in BLT1-deficient mice reveals a role for LTB4 and BLT1 in smooth muscle cell recruitment. *Circulation* 2005; **112**:578-86.
86. Hoffmann A, Baltimore D. Circuitry of nuclear factor kappaB signaling. *Immunol Rev* 2006; **210**:171-86.
87. Hu J, Van den Steen PE, Sang QX, Opdenakker G. Matrix metalloproteinase inhibitors as therapy for inflammatory and vascular diseases. *Nat Rev Drug Discov* 2007; **6**:480-498.

88. Huang L, Zhao A, Wong F, Ayala JM, Struthers M, Ujjainwalla F, Wright SD, Springer MS, Evans J, Cui J. Leukotriene B4 strongly increases monocyte chemoattractant protein-1 in human monocytes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; **24**:1783-88.
89. Ito N, Yokomizo T, Sasaki T, Kurosu H, Penninger J, Kanaho Y, Katada T, Hanaoka K, Shimizu T. Requirement of phosphatidylinositol 3-kinase activation and calcium influx for leukotriene B4-induced enzyme release. *J Biol Chem* 2002; **277**:44898-904.
90. Jala VR, Haribabu B. Leukotrienes and atherosclerosis: new roles for old mediators. *Trends Immunol* 2004; **25**:315-22.
91. Jiang Y, Beller DI, Frendl G, Graves DT. Monocyte chemoattractant protein-1 regulates adhesion molecule expression and cytokine production in human monocytes. *J Immunol* 1992; **148**:2423-28.
92. Johnson JL, Jackson CL, Angelini GD, George SJ. Activation of matrix-degrading metalloproteinases by mast cell proteases in atherosclerotic plaques. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; **18**:1707-15.
93. Jones CB, Sane DC, Herrington DM. Matrix metalloproteinases: a review of their structure and role in acute coronary syndrome. *Cardiovasc Res* 2003; **59**:812-23.
94. Kai H, Ikeda H, Yasukawa H, Kai M, Seki Y, Kuwahara F, Ueno T, Sugi K, Imaizumi T. Peripheral blood levels of matrix metalloproteinases-2 and -9 are elevated in patients with acute coronary syndromes. *J Am Coll Cardiol* 1998; **32**:368-72.
95. Kajimoto K, Shioji K, Ishida C, Iwanaga Y, Kokubo Y, Tomoike H, Miyazaki S, Nonogi H, Goto Y, Iwai N. Validation of the association between the gene encoding 5-lipoxygenase-activating protein and myocardial infarction in a Japanese population. *Circ J* 2005; **69**:1029-34.
96. Kakar P, Lip GY. Hypertension: endothelial dysfunction, the prothrombotic state and antithrombotic therapy. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2007; **5**:441-50.
97. Kanda N, Watanabe S. Leukotriene B(4) enhances tumour necrosis factor-alpha-induced CCL27 production in human keratinocytes. *Clin Exp Allergy* 2007; **37**:1074-82.
98. Keaney JF, Jr., Vita JA. The value of inflammation for predicting unstable angina. *N Engl J Med* 2002; **347**:55-57.
99. Kersten S, Wahli W. Peroxisome proliferator activated receptor agonists. *EXS* 2000; **89**:141-51.

100. Kim ND, Chou RC, Seung E, Tager AM, Luster AD. A unique requirement for the leukotriene B4 receptor BLT1 for neutrophil recruitment in inflammatory arthritis. *J Exp Med* 2006; **203**:829-35.
101. Kinlay S, Schwartz GG, Olsson AG, Rifai N, Leslie SJ, Sasiela WJ, Szarek M, Libby P, Ganz P. High-dose atorvastatin enhances the decline in inflammatory markers in patients with acute coronary syndromes in the MIRACL study. *Circulation* 2003; **108**:1560-1566.
102. Kohyama T, Ertl RF, Valenti V, Spurzem J, Kawamoto M, Nakamura Y, Veys T, Allegra L, Romberger D, Rennard SI. Prostaglandin E(2) inhibits fibroblast chemotaxis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001; **281**:L1257-L1263.
103. Kumar A, Takada Y, Boriek AM, Aggarwal BB. Nuclear factor-kappaB: its role in health and disease. *J Mol Med* 2004; **82**:434-48.
104. Kuzuya M, Iguchi A. Role of matrix metalloproteinases in vascular remodeling. *J Atheroscler Thromb* 2003; **10**:275-82.
105. LaRosa JC, Grundy SM, Waters DD, Shear C, Barter P, Fruchart JC, Gotto AM, Greten H, Kastelein JJ, Shepherd J, Wenger NK. Intensive lipid lowering with atorvastatin in patients with stable coronary disease. *N Engl J Med* 2005; **352**:1425-35.
106. Latruffe N, Vamecq J. Peroxisome proliferators and peroxisome proliferator activated receptors (PPARs) as regulators of lipid metabolism. *Biochimie* 1997; **79**:81-94.
107. Laws PE, Spark JI, Cowled PA, Fitridge RA. The role of statins in vascular disease. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2004; **27**:6-16.
108. Lee JI, Burckart GJ. Nuclear factor kappa B: important transcription factor and therapeutic target. *J Clin Pharmacol* 1998; **38**:981-93.
109. Levick SP, Loch DC, Taylor SM, Janicki JS. Arachidonic acid metabolism as a potential mediator of cardiac fibrosis associated with inflammation. *J Immunol* 2007; **178**:641-46.
110. Libby P. Molecular bases of the acute coronary syndromes. *Circulation* 1995; **91**:2844-50.
111. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 2002; **420**:868-74.
112. Libby P, Galis ZS. Cytokines regulate genes involved in atherogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 1995; **748**:158-68.
113. Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 2002; **105**:1135-43.



114. Linton MF, Fazio S. Cyclooxygenase-2 and inflammation in atherosclerosis. *Curr Opin Pharmacol* 2004; **4**:116-23.
115. Liu Y, Shepherd EG, Nelin LD. MAPK phosphatases--regulating the immune response. *Nat Rev Immunol* 2007; **7**:202-12.
116. Liuzzo G, Biasucci LM, Gallimore JR, Grillo RL, Rebuzzi AG, Pepys MB, Maseri A. The prognostic value of C-reactive protein and serum amyloid a protein in severe unstable angina. *N Engl J Med* 1994; **331**:417-24.
117. Liuzzo G, Santamaria M, Biasucci LM, Narducci M, Colafrancesco V, Porto A, Brugaletta S, Pinnelli M, Rizzello V, Maseri A, Crea F. Persistent activation of nuclear factor kappa-B signaling pathway in patients with unstable angina and elevated levels of C-reactive protein evidence for a direct proinflammatory effect of azide and lipopolysaccharide-free C-reactive protein on human monocytes via nuclear factor kappa-B activation. *J Am Coll Cardiol* 2007; **49**:185-94.
118. Liuzzo G, Vallejo AN, Kopecky SL, Frye RL, Holmes DR, Goronzy JJ, Weyand CM. Molecular fingerprint of interferon-gamma signaling in unstable angina. *Circulation* 2001; **103**:1509-14.
119. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001; **25**:402-8.
120. Loftus IM, Naylor AR, Goodall S, Crowther M, Jones L, Bell PR, Thompson MM. Increased matrix metalloproteinase-9 activity in unstable carotid plaques. A potential role in acute plaque disruption. *Stroke* 2000; **31**:40-47.
121. Lotzer K, Funk CD, Habenicht AJ. The 5-lipoxygenase pathway in arterial wall biology and atherosclerosis. *Biochim Biophys Acta* 2005; **1736**:30-37.
122. Luchtefeld M, Drexler H, Schieffer B. 5-Lipoxygenase is involved in the angiotensin II-induced NAD(P)H-oxidase activation. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; **308**:668-72.
123. Lundeen KA, Sun B, Karlsson L, Fourie AM. Leukotriene B4 receptors BLT1 and BLT2: expression and function in human and murine mast cells. *J Immunol* 2006; **177**:3439-47.
124. Mann JM, Davies MJ. Vulnerable plaque. Relation of characteristics to degree of stenosis in human coronary arteries. *Circulation* 1996; **94**:928-31.
125. Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Fahmi H. Cyclooxygenase-2 and prostaglandins in articular tissues. *Semin Arthritis Rheum* 2003; **33**:155-67.

126. Martin-Ventura JL, Blanco-Colio LM, Gomez-Hernandez A, Munoz-Garcia B, Vega M, Serrano J, Ortega L, Hernandez G, Tunon J, Egido J. Intensive treatment with atorvastatin reduces inflammation in mononuclear cells and human atherosclerotic lesions in one month. *Stroke* 2005; **36**:1796-800.
127. Martin-Ventura JL, Blanco-Colio LM, Munoz-Garcia B, Gomez-Hernandez A, Arribas A, Ortega L, Tunon J, Egido J. NF-kappaB activation and Fas ligand overexpression in blood and plaques of patients with carotid atherosclerosis: potential implication in plaque instability. *Stroke* 2004; **35**:458-63.
128. Martinez-Gonzalez J, Badimon L. Mechanisms underlying the cardiovascular effects of COX-inhibition: benefits and risks. *Curr Pharm Des* 2007; **13**:2215-27.
129. McCall MR, van den Berg JJ, Kuypers FA, Tribble DL, Krauss RM, Knoff LJ, Forte TM. Modification of LCAT activity and HDL structure. New links between cigarette smoke and coronary heart disease risk. *Arterioscler Thromb* 1994; **14**:248-53.
130. Mehrabian M, Allayee H, Wong J, Shi W, Wang XP, Shaposhnik Z, Funk CD, Lusis AJ. Identification of 5-lipoxygenase as a major gene contributing to atherosclerosis susceptibility in mice. *Circ Res* 2002; **91**:120-126.
131. Meyers MR, Gokce N. Endothelial dysfunction in obesity: etiological role in atherosclerosis. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2007; **14**:365-69.
132. Minghetti L, Pocchiari M. Cyclooxygenase-2, prostaglandin E2, and microglial activation in prion diseases. *Int Rev Neurobiol* 2007; **82**:265-75.
133. Mitchinson MJ. The new face of atherosclerosis. *Br J Clin Pract* 1994; **48**:149-51.
134. Miyahara N, Miyahara S, Takeda K, Gelfand EW. Role of the LTB4/BLT1 pathway in allergen-induced airway hyperresponsiveness and inflammation. *Allergol Int* 2006; **55**:91-97.
135. Monaco C, Andreacos E, Kiriakidis S, Mauri C, Bicknell C, Foxwell B, Cheshire N, Paleolog E, Feldmann M. Canonical pathway of nuclear factor kappa B activation selectively regulates proinflammatory and prothrombotic responses in human atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; **101**:5634-39.
136. Monaco C, Paleolog E. Nuclear factor kappaB: a potential therapeutic target in atherosclerosis and thrombosis. *Cardiovasc Res* 2004; **61**:671-82.
137. Morel DW, DiCorleto PE, Chisolm GM. Endothelial and smooth muscle cells alter low density lipoprotein in vitro by free radical oxidation. *Arteriosclerosis* 1984; **4**:357-64.

138. Moreno PR, Falk E, Palacios IF, Newell JB, Fuster V, Fallon JT. Macrophage infiltration in acute coronary syndromes. Implications for plaque rupture. *Circulation* 1994; **90**:775-78.
139. Murphy RC, Gijon MA. Biosynthesis and metabolism of leukotrienes. *Biochem J* 2007; **405**:379-95.
140. Narumiya S, Sugimoto Y, Ushikubi F. Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *Physiol Rev* 1999; **79**:1193-226.
141. Nissen SE, Tuzcu EM, Schoenhagen P, Brown BG, Ganz P, Vogel RA, Crowe T, Howard G, Cooper CJ, Brodie B, Grines CL, DeMaria AN. Effect of intensive compared with moderate lipid-lowering therapy on progression of coronary atherosclerosis: a randomized controlled trial. *JAMA* 2004; **291**:1071-80.
142. Oemar BS, Werner A, Garnier JM, Do DD, Godoy N, Nauck M, Marz W, Rupp J, Pech M, Luscher TF. Human connective tissue growth factor is expressed in advanced atherosclerotic lesions. *Circulation* 1997; **95**:831-39.
143. Paramo JA, Rodriguez JA, Belouqui O, Orbe J. Monocyte cyclooxygenase-2 activity: a new therapeutic target for atherosclerosis? *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord* 2005; **5**:303-11.
144. Park JY, Pillinger MH, Abramson SB. Prostaglandin E2 synthesis and secretion: the role of PGE2 synthases. *Clin Immunol* 2006; **119**:229-40.
145. Pedersen TR, Faergeman O, Kastelein JJ, Olsson AG, Tikkanen MJ, Holme I, Larsen ML, Bendiksen FS, Lindahl C, Szarek M, Tsai J. High-dose atorvastatin vs usual-dose simvastatin for secondary prevention after myocardial infarction: the IDEAL study: a randomized controlled trial. *JAMA* 2005; **294**:2437-45.
146. Peters-Golden M, Henderson WR, Jr. Leukotrienes. *N Engl J Med* 2007; **357**:1841-54.
147. Qiu H, Gabrielsen A, Agardh HE, Wan M, Wetterholm A, Wong CH, Hedin U, Swedenborg J, Hansson GK, Samuelsson B, Paulsson-Berne G, Haeggstrom JZ. Expression of 5-lipoxygenase and leukotriene A4 hydrolase in human atherosclerotic lesions correlates with symptoms of plaque instability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; **103**:8161-66.
148. Qiu H, Johansson AS, Sjostrom M, Wan M, Schroder O, Palmblad J, Haeggstrom JZ. Differential induction of BLT receptor expression on human endothelial cells by lipopolysaccharide, cytokines, and leukotriene B4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; **103**:6913-18.

149. Radmark O, Samuelsson B. 5-lipoxygenase: regulation and possible involvement in atherosclerosis. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2007; **83**:162-74.
150. Radmark O, Werz O, Steinhilber D, Samuelsson B. 5-Lipoxygenase: regulation of expression and enzyme activity. *Trends Biochem Sci* 2007; **32**:332-41.
151. Raggi P, Taylor A, Fayad Z, O'Leary D, Nissen S, Rader D, Shaw LJ. Atherosclerotic plaque imaging: contemporary role in preventive cardiology. *Arch Intern Med* 2005; **165**:2345-53.
152. Rangaswamy S, Penn MS, Saidel GM, Chisolm GM. Exogenous oxidized low-density lipoprotein injures and alters the barrier function of endothelium in rats in vivo. *Circ Res* 1997; **80**:37-44.
153. Ray KK, Cannon CP. Pathological changes in acute coronary syndromes: the role of statin therapy in the modulation of inflammation, endothelial function and coagulation. *J Thromb Thrombolysis* 2004; **18**:89-101.
154. Ray KK, Cannon CP. The potential relevance of the multiple lipid-independent (pleiotropic) effects of statins in the management of acute coronary syndromes. *J Am Coll Cardiol* 2005; **46**:1425-33.
155. Rayner K, Van ES, Groot PH, Reape TJ. Localisation of mRNA for JE/MCP-1 and its receptor CCR2 in atherosclerotic lesions of the ApoE knockout mouse. *J Vasc Res* 2000; **37**:93-102.
156. Rezaie-Majd A, Prager GW, Bucek RA, Schernthaner GH, Maca T, Kress HG, Valent P, Binder BR, Minar E, Baghestanian M. Simvastatin reduces the expression of adhesion molecules in circulating monocytes from hypercholesterolemic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; **23**:397-403.
157. Ridker PM, Cannon CP, Morrow D, Rifai N, Rose LM, McCabe CH, Pfeffer MA, Braunwald E. C-reactive protein levels and outcomes after statin therapy. *N Engl J Med* 2005; **352**:20-28.
158. Ridker PM, Hennekens CH, Roitman-Johnson B, Stampfer MJ, Allen J. Plasma concentration of soluble intercellular adhesion molecule 1 and risks of future myocardial infarction in apparently healthy men. *Lancet* 1998; **351**:88-92.
159. Ritchie ME. Nuclear factor-kappaB is selectively and markedly activated in humans with unstable angina pectoris. *Circulation* 1998; **98**:1707-13.
160. Roberts PJ, Der CJ. Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene* 2007; **26**:3291-310.

161. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999; **340**:115-26.
162. Roux PP, Blenis J. ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev* 2004; **68**:320-344.
163. Sacks FM, Pfeffer MA, Moye LA, Rouleau JL, Rutherford JD, Cole TG, Brown L, Warnica JW, Arnold JM, Wun CC, Davis BR, Braunwald E. The effect of pravastatin on coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels. Cholesterol and Recurrent Events Trial investigators. *N Engl J Med* 1996; **335**:1001-9.
164. Samuelsson B. Leukotrienes: mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation. *Science* 1983; **220**:568-75.
165. Schonbeck U, Libby P. Inflammation, immunity, and HMG-CoA reductase inhibitors: statins as antiinflammatory agents? *Circulation* 2004; **109**:II18-II26.
166. Schonbeck U, Sukhova GK, Graber P, Coulter S, Libby P. Augmented expression of cyclooxygenase-2 in human atherosclerotic lesions. *Am J Pathol* 1999; **155**:1281-91.
167. Schwartz GG, Olsson AG, Ezekowitz MD, Ganz P, Oliver MF, Waters D, Zeiher A, Chaitman BR, Leslie S, Stern T. Effects of atorvastatin on early recurrent ischemic events in acute coronary syndromes: the MIRACL study: a randomized controlled trial. *JAMA* 2001; **285**:1711-18.
168. Segerer S, Nelson PJ, Schlondorff D. Chemokines, chemokine receptors, and renal disease: from basic science to pathophysiologic and therapeutic studies. *J Am Soc Nephrol* 2000; **11**:152-76.
169. Serio KJ, Reddy KV, Bigby TD. Lipopolysaccharide induces 5-lipoxygenase-activating protein gene expression in THP-1 cells via a NF-kappaB and C/EBP-mediated mechanism. *Am J Physiol Cell Physiol* 2005; **288**:C1125-C1133.
170. Shepherd J, Cobbe SM, Ford I, Isles CG, Lorimer AR, MacFarlane PW, McKillop JH, Packard CJ. Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia. West of Scotland Coronary Prevention Study Group. *N Engl J Med* 1995; **333**:1301-7.
171. Smith SW, Whitwam W. Acute coronary syndromes. *Emerg Med Clin North Am* 2006; **24**:53-89, vi.
172. Solheim S, Seljeflot I, Arnesen H, Eritsland J, Eikvar L. Reduced levels of TNF alpha in hypercholesterolemic individuals after treatment with pravastatin for 8 weeks. *Atherosclerosis* 2001; **157**:411-15.

173. Solomon SD, McMurray JJ, Pfeffer MA, Wittes J, Fowler R, Finn P, Anderson WF, Zauber A, Hawk E, Bertagnoli M. Cardiovascular risk associated with celecoxib in a clinical trial for colorectal adenoma prevention. *N Engl J Med* 2005; **352**:1071-80.
174. Spanbroek R, Grabner R, Lotzer K, Hildner M, Urbach A, Ruhling K, Moos MP, Kaiser B, Cohnert TU, Wahlers T, Zieske A, Plenz G, Robenek H, Salbach P, Kuhn H, Radmark O, Samuelsson B, Habenicht AJ. Expanding expression of the 5-lipoxygenase pathway within the arterial wall during human atherogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; **100**:1238-43.
175. Steinberg D, Lewis A. Conner Memorial Lecture. Oxidative modification of LDL and atherogenesis. *Circulation* 1997; **95**:1062-71.
176. Stemme V, Swedenborg J, Claesson H, Hansson GK. Expression of cyclo-oxygenase-2 in human atherosclerotic carotid arteries. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2000; **20**:146-52.
177. Subbarao K, Jala VR, Mathis S, Suttles J, Zacharias W, Ahamed J, Ali H, Tseng MT, Haribabu B. Role of leukotriene B4 receptors in the development of atherosclerosis: potential mechanisms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; **24**:369-75.
178. Sugimoto Y, Narumiya S. Prostaglandin E receptors. *J Biol Chem* 2007; **282**:11613-17.
179. Taccone-Gallucci M, Manca-di-Villahermosa S, Battistini L, Stuffer RG, Tedesco M, Maccarrone M. N-3 PUFAs reduce oxidative stress in ESRD patients on maintenance HD by inhibiting 5-lipoxygenase activity. *Kidney Int* 2006; **69**:1450-1454.
180. Tager AM, Luster AD. BLT1 and BLT2: the leukotriene B(4) receptors. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2003; **69**:123-34.
181. Tak PP, Firestein GS. NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases. *J Clin Invest* 2001; **107**:7-11.
182. Tedgui A, Mallat Z. Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways. *Physiol Rev* 2006; **86**:515-81.
183. Tong WG, Ding XZ, Talamonti MS, Bell RH, Adrian TE. LTB4 stimulates growth of human pancreatic cancer cells via MAPK and PI-3 kinase pathways. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; **335**:949-56.
184. Torre-Amione G. Immune activation in chronic heart failure. *Am J Cardiol* 2005; **95**:3C-8C.

185. Toschi V, Gallo R, Lettino M, Fallon JT, Gertz SD, Fernandez-Ortiz A, Chesebro JH, Badimon L, Nemerson Y, Fuster V, Badimon JJ. Tissue factor modulates the thrombogenicity of human atherosclerotic plaques. *Circulation* 1997; **95**:594-99.
186. Tozer EC, Carew TE. Residence time of low-density lipoprotein in the normal and atherosclerotic rabbit aorta. *Circ Res* 1997; **80**:208-18.
187. Trudeau J, Hu H, Chibana K, Chu HW, Westcott JY, Wenzel SE. Selective downregulation of prostaglandin E2-related pathways by the Th2 cytokine IL-13. *J Allergy Clin Immunol* 2006; **117**:1446-54.
188. Tunon J, Martin-Ventura JL, Blanco-Colio LM, Egido J. Mechanisms of action of statins in stroke. *Expert Opin Ther Targets* 2007; **11**:273-78.
189. Tunon J, Ruiz-Ortega M, Egido J. Regulation of matrix proteins and impact on vascular structure. *Curr Hypertens Rep* 2000; **2**:106-13.
190. Tuomisto TT, Korkeela A, Rutanen J, Viita H, Brasen JH, Riekkinen MS, Rissanen TT, Karkola K, Kiraly Z, Kolble K, Yla-Herttuala S. Gene expression in macrophage-rich inflammatory cell infiltrates in human atherosclerotic lesions as studied by laser microdissection and DNA array: overexpression of HMG-CoA reductase, colony stimulating factor receptors, CD11A/CD18 integrins, and interleukin receptors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; **23**:2235-40.
191. Turjanski AG, Vaque JP, Gutkind JS. MAP kinases and the control of nuclear events. *Oncogene* 2007; **26**:3240-3253.
192. van der Wal AC, Becker AE, van der Loos CM, Das PK. Site of intimal rupture or erosion of thrombosed coronary atherosclerotic plaques is characterized by an inflammatory process irrespective of the dominant plaque morphology. *Circulation* 1994; **89**:36-44.
193. van der Wal AC, Das PK, Tigges AJ, Becker AE. Adhesion molecules on the endothelium and mononuclear cells in human atherosclerotic lesions. *Am J Pathol* 1992; **141**:1427-33.
194. Vidal C, Gomez-Hernandez A, Sanchez-Galan E, Gonzalez A, Ortega L, Gomez-Gerique JA, Tunon J, Egido J. Licofelone, a balanced inhibitor of cyclooxygenase and 5-lipoxygenase, reduces inflammation in a rabbit model of atherosclerosis. *J Pharmacol Exp Ther* 2007; **320**:108-16.
195. Vila L. Cyclooxygenase and 5-lipoxygenase pathways in the vessel wall: role in atherosclerosis. *Med Res Rev* 2004; **24**:399-424.

196. Walter DH, Rittig K, Bahlmann FH, Kirchmair R, Silver M, Murayama T, Nishimura H, Losordo DW, Asahara T, Isner JM. Statin therapy accelerates reendothelialization: a novel effect involving mobilization and incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *Circulation* 2002; **105**:3017-24.
197. Wang Y. Mitogen-activated protein kinases in heart development and diseases. *Circulation* 2007; **116**:1413-23.
198. Webb NR. Secretory phospholipase A2 enzymes in atherogenesis. *Curr Opin Lipidol* 2005; **16**:341-44.
199. Weber C, Erl W, Weber KS, Weber PC. Effects of oxidized low density lipoprotein, lipid mediators and statins on vascular cell interactions. *Clin Chem Lab Med* 1999; **37**:243-51.
200. Werner N, Nickenig G. Endothelial progenitor cells in health and atherosclerotic disease. *Ann Med* 2007; **39**:82-90.
201. White WB. Cardiovascular risk, hypertension, and NSAIDs. *Curr Rheumatol Rep* 2007; **9**:36-43.
202. Wilcox JN, Subramanian RR, Sundell CL, Tracey WR, Pollock JS, Harrison DG, Marsden PA. Expression of multiple isoforms of nitric oxide synthase in normal and atherosclerotic vessels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; **17**:2479-88.
203. Wilson SH, Best PJ, Edwards WD, Holmes DR, Jr., Carlson PJ, Celermajer DS, Lerman A. Nuclear factor-kappaB immunoreactivity is present in human coronary plaque and enhanced in patients with unstable angina pectoris. *Atherosclerosis* 2002; **160**:147-53.
204. Wiviott SD, Braunwald E. Unstable angina and non-ST-segment elevation myocardial infarction: part I. Initial evaluation and management, and hospital care. *Am Fam Physician* 2004; **70**:525-32.
205. Woo CH, You HJ, Cho SH, Eom YW, Chun JS, Yoo YJ, Kim JH. Leukotriene B(4) stimulates Rac-ERK cascade to generate reactive oxygen species that mediates chemotaxis. *J Biol Chem* 2002; **277**:8572-78.
206. Wu KK. Control of cyclooxygenase-2 transcriptional activation by pro-inflammatory mediators. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2005; **72**:89-93.
207. Xiao W. Advances in NF-kappaB signaling transduction and transcription. *Cell Mol Immunol* 2004; **1**:425-35.



208. Xu Z, Choudhary S, Okada Y, Voznesensky O, Alander C, Raisz L, Pilbeam C. Cyclooxygenase-2 gene disruption promotes proliferation of murine calvarial osteoblasts in vitro. *Bone* 2007; **41**:68-76.
209. Yla-Herttuala S, Lipton BA, Rosenfeld ME, Sarkioja T, Yoshimura T, Leonard EJ, Witztum JL, Steinberg D. Expression of monocyte chemoattractant protein 1 in macrophage-rich areas of human and rabbit atherosclerotic lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; **88**:5252-56.
210. Yoshida M. Potential role of statins in inflammation and atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb* 2003; **10**:140-144.
211. Zhang QH, She MP. Biological behaviour and role of endothelial progenitor cells in vascular diseases. *Chin Med J (Engl )* 2007; **120**:2297-303.
212. Zhao L, Funk CD. Lipoxygenase pathways in atherogenesis. *Trends Cardiovasc Med* 2004; **14**:191-95.
213. Zhao L, Moos MP, Grabner R, Pedrono F, Fan J, Kaiser B, John N, Schmidt S, Spanbroek R, Lotzer K, Huang L, Cui J, Rader DJ, Evans JF, Habenicht AJ, Funk CD. The 5-lipoxygenase pathway promotes pathogenesis of hyperlipidemia-dependent aortic aneurysm. *Nat Med* 2004; **10**:966-73.
214. Zhou YJ, Wang JH, Li L, Yang HW, Wen dL, He QC. Expanding expression of the 5-lipoxygenase/leukotriene B4 pathway in atherosclerotic lesions of diabetic patients promotes plaque instability. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; **363**:30-36.

**Anexo**

---

**Los resultados presentados en esta tesis han sido publicados en:**

Gomez-Hernandez A, **Sánchez-Galán E**, Ortego M, Martin-Ventura JL, Blanco-Colio LM, Tarín-Vicente N, Jiménez-Nacher JJ, López-Bescos L, Egido J, Tunon J. Effect of Intensive Atorvastatin Therapy on Prostaglandin E<sub>2</sub> Levels and Metalloproteinase-9 Activity in the Plasma of Patients with Non-ST-Elevation Acute Coronary Síndrome. *AMJ Cardiol* 2008 Jul (en prensa)

**Sánchez-Galán E**, Gomez-Hernandez A, Vidal C, Martin-Ventura JL, Blanco-Colio LM, Muñoz-García B, Ortega L, Tunon J, Egido J. Leukotriene B4 enhances the activity of NF-κB pathway through BLT1 and BLT2 receptors in atherosclerosis. *Cardiovascular Research* (en revisión).

---

**Los resultados de esta tesis han sido parcialmente presentados en las siguientes reuniones científicas:**

**Sánchez-Galán E**, Vidal C, Gómez-Hernández A, Martín-Ventura JL, Blanco-Colio LM, Muñón J, Egido J. 5-LO/LTA4H pathway and LTB4 receptors are increase in plaque of patients with carotid atherosclerosis. Role of LTB4 in NF-κB activation. *76<sup>th</sup> Congress of the European Atherosclerosis Society (EAS 2007)*.

Gómez-Hernández A, **Sánchez-Galán E**, Jiménez-Nácher JJ, Martín-Ventura JL, Tarín-Vicente N, López Bescós L, Egido J, Tuñón J. El tratamiento intensivo con atorvastatina reduce los niveles de prostaglandina E2 y la actividad de metaloproteínasa-9 en plasma en el síndrome coronario agudo. Congreso de la SEC, Madrid. 2007

**Sánchez-Galán E**, Gómez-Hernández A, Vidal C, Martín-Ventura JL, Blanco-Colio LM, Ortega L, Tuñón J, Egido J. The 5-lipoxygenase and leukotriene A4 hydrolase pathway is augmented in blood mononuclear cells and plaque of patients with carotid atherosclerosis. *Young Meeting Investigator*, Malmö, Sweden. 2005

---

**Otros trabajos publicados durante el desarrollo de la Tesis:**

Rodríguez-Vita J; **Sánchez-Galán E**, Santamaría B; Sánchez-López E, Rodríguez-Díez R; Blanco-Colio L; Egido J; Ortiz A; Ruiz-Ortega M. Description of a novel mechanism of 3-hydroxy-3-

methylglutaryl CoA reductase inhibitors in vascular smooth muscle cells: The regulation of Smad pathway. *Circulation Research* (en revisión)

Lorenzo O, Blanco-Colio LM, Martín-Ventura JL, **Sánchez-Galán E**, Ares-Carrasco S, Irene Zubiri I, Egido E, Tuñón J. Nuevos mediadores implicados en la génesis de la aterosclerosis. *Clin Invest Arterioscler*. 2008. (en prensa)

Vidal C<sup>1</sup>, **Sánchez-Galán E**<sup>1</sup>, Gomez-Hernandez A<sup>1</sup>, Gonzalez A, Ortega L, Gomez-Gerique JA, Tunon J, Egido J. Licofelone, a balanced inhibitor of cyclooxygenase and 5-lipoxygenase, reduces inflammation in a rabbit model of atherosclerosis. *J Pharmacol Exp Ther*. 2007 Jan; 320(1):108-16. (1: los autores han contribuido por igual durante el desarrollo del trabajo)

Tuñón J., Martín-Ventura J.L., Blanco-Colio L., Vidal C.; **Sánchez-Galán E.**; Egido J. Efectos pleiotropicos de las estatinas: mitos y realidades. *Clin Invest Arterioscl*. 2007;19 Supl. 3:4-12

Gomez-Hernandez A, Martin-Ventura JL, **Sánchez-Galán E**, Vidal C, Ortego M, Blanco-Colio LM, Ortega L, Tunon J, Egido J. Overexpression of COX-2, Prostaglandin E synthase-1 and prostaglandin E receptors in blood mononuclear cells and plaque of patients with carotid atherosclerosis: regulation by nuclear factor-kappaB. *Atherosclerosis*. 2006 Jul; 187(1):139-49.

Gomez-Hernandez A, **Sánchez-Galán E**, Martin-Ventura JL, Vidal C, Blanco-Colio LM, Ortego M, Vega M, Serrano J, Ortega L, Hernandez G, Tunon J, Egido J. Atorvastatin reduces the expression of prostaglandin E2 receptors in human carotid atherosclerotic plaques and monocytic cells: potential implications for plaque stabilization. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2006 Jan; 47(1):60-9.

Tunon J., **Sánchez-Galán E.**, Gomez-Hernandez A., Vidal C., Martin-Ventura JL., Egido J. Marcadores inflamatorios de Riesgo Cardiovascular. Más allá de la PCR. *Cardiovascular Risk Factors*. Publicado en el número de Febrero de 2006.

Ortego M, Gomez-Hernandez A, Vidal C, **Sánchez-Galán E**, Blanco-Colio LM, Martin-Ventura JL, Tunon J, Diaz C, Hernandez G, Egido J. HMG-CoA reductase inhibitors reduce I kappa B kinase activity induced by oxidative stress in monocytes and vascular smooth muscle cells. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2005 May; 45(5):468-75.

**Capítulos en libros:**

Lorenzo O, Zubiri I, Ares S, **Sánchez-Galán E**, Egido J, Tuñón J. Efecto de la diabetes sobre el aparato cardiovascular. *Aterotrombosis*. Editores: Tuñón J, Egido J, López Bescós L. 2ª edición. Editorial Línea de Comunicación, Madrid 2008. (en prensa)

Tuñón J, Gómez-Hernández A, Vidal C, **Sánchez Galán E**, Martín-Ventura JL, Egido J. Nuevos Biomarcadores de Riesgo Cardiovascular. En: Soltero I (ed.): *Aterosclerosis al Día (VI)*. Caracas, Asociación Venezolana de Aterosclerosis, 2005.

Egido J., Martín-Ventura, J.L., Blanco-Colio L.M., Gómez-Hernández A., **Sánchez-Galán E.**, Vidal C., Tuñón J. Aterotrombosis. De la disfunción endotelial a la regeneración miocárdica. Capítulo del libro *“Aterotrombosis en el siglo XXI”*, coordinado por los Dres. Jesús Egido, José Tuñón y Lorenzo López Bescos. Madrid 2004.

---